



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Agropecuarias
Escuela para Graduados

**PROPUESTA METODOLÓGICA PARA
DETERMINAR LA CALIDAD EN SEMILLAS DE
BUFFEL GRASS (*Cenchrus ciliaris* L.)**

César Germán Agüero

Tesis para optar al Grado Académico de
Magister en Ciencias Agropecuarias con
Mención Tecnología de Semillas

Córdoba, 2017

**PROPUESTA METODOLÓGICA PARA DETERMINAR
LA CALIDAD EN SEMILLAS DE BUFFEL GRASS
(*Cenchrus ciliaris* L.)**

César Germán Agüero

Comisión Asesora de Tesis

Director: Ing. Agr. (M.Sc.) Roberto Oscar Rolando

Asesores: Ing. Agr. (Ph.D.) Cristiano Casini (Codirector)

Ing. Agr. (M.Sc.) Margot Tablada

Tribunal Examinador de Tesis

Ing. Agr. (M.Sc.) Elena Margot Tablada

Ing. Agr. (M.Sc.) Jimena Elisa Martinat

Ing. Agr. (M.Sc.) Carina Del Valle Gallo

Presentación formal académica: 23 de noviembre de 2017

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Universidad Nacional de Córdoba

Agradecimientos

A quienes con su valioso y desinteresado aporte permitieron la realización de este trabajo de Tesis: Roberto Rolando, Margot Tablada, Cristiano Casini, Gonzalo Pereyra, Cecilia Acevedo, Camila Miserere, Belén Herrera, Selva Núñez y Andrea Belmonte.

A mi esposa Belén

A mi hija Paulina

A mis padres Omar y Alicia

A mis hermanos Marcos, David y Julieta

Resumen

Un problema al evaluar la calidad fisiológica en *Cenchrus ciliaris* L. es el bajo porcentaje de germinación obtenido en los ensayos debido a que la dormición de las semillas no es eliminada eficazmente con los pretratamientos recomendados por las reglas ISTA. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una metodología de análisis para determinar con mayor precisión la calidad física y fisiológica de las semillas de *Cenchrus ciliaris* L. En primer término, previo a la realización de los ensayos de germinación, se desarrolló la metodología para conocer el porcentaje de fascículos llenos y la viabilidad por tetrazolio. Los ensayos de germinación se realizaron con semillas recién cosechadas de los cultivares 'Texas' y 'Biloela' y extendieron por 9 meses, con intervalos de 3 meses entre cada uno. Se utilizaron diferentes alternativas de preparación de las semillas: fascículos intactos, fascículos escarificados, cariósides intactas y cariósides escarificadas. Se evaluó la evolución de la dormición en el tiempo (0, 3, 6 y 9 meses) y la ruptura de la misma con diferentes tratamientos (testigo, frío, calor, KNO_3 y AG_3). La relación porcentual de fascículos llenos y la viabilidad por tetrazolio resultaron de gran importancia para conocer la calidad inicial de las semillas, lo que facilita la integración de los resultados de germinación y la toma de decisiones. Los resultados indican que, en el primer momento de análisis, cariósides escarificadas fueron los de mayor germinación, independientemente de los pretratamientos. En los almacenamientos de 3, 6 y 9 meses no hubo diferencias significativas entre cariósides con y sin escarificación, pero sí entre éstos y los fascículos.

Palabras claves: fascículo, cariósida, viabilidad, pretratamientos, germinación.

Abstract

One problem in assessing the physiological quality in *Cenchrus ciliaris* L. is the low percentages of germination obtained in ISTA test because dormancy in seeds is not eliminated effectively with the recommended pre-treatments. The objective of this work was to develop a method of analysis to determine more accurately the physical and physiological quality of the seeds of *Cenchrus ciliaris* L. First, prior to the germination trials, the methodology was developed to know the percentage of filled fascicles and the viability by tetrazolium. Germination trials used freshly harvested Texas and Biloela seeds. The test were conducted for 9 months, with intervals of 3 months between each. In the germination tests different alternative seeds were used: intact fascicles, scarified fascicles, intact cariopses and scarified ones. The evolution of the dormancy in time (0, 3, 6 and 9 months) and the breakdown with different treatments (control, cold, heat, KNO_3 and AG_3) were evaluated. The percentage ratio of full fascicles and the viability by tetrazolium were of great importance to know the initial quality of the seeds, which facilitated the integration of germination results and decision making. The results indicated that, at the first moment of analysis, scarified cariósides showed the highest germination percentages, independently of the pre-treatments. In the case of seeds stored for 3, 6 and 9 months, there were no significant differences between cariopsides, with and without scarification, but there were differences between these and fascicles.

Keywords: fascicle, cariopse, viability, pre-treatments, germination.

TABLA DE CONTENIDOS

LISTA DE TABLAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS Y/O SÍMBOLOS	XV
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
HIPÓTESIS	5
OBJETIVO GENERAL	5
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	6
BIBLIOGRAFÍA	7
CAPÍTULO II. CALIDAD FÍSICA	10
INTRODUCCIÓN	10
OBJETIVOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Determinación de fascículos llenos y vacíos	14
Número medio de cariósides presentes por fascículo	15
Peso de 1000 fascículos	15
Diseño experimental y análisis estadístico	15
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	16
CONCLUSIONES	19
BIBLIOGRAFÍA	20
CAPÍTULO III. VIABILIDAD POR TETRAZOLIO	23
INTRODUCCIÓN	23
OBJETIVO	26
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Material biológico para la realización de los ensayos	26
Evaluación de tipos de corte	27
Determinación del tiempo óptimo de tinción y concentración de tetrazolio	28
Determinación de los patrones de tinción	28
Diseño experimental y análisis estadístico	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	30
Tipo de corte en cariósides	30
Determinación del tiempo de tinción y concentración de tetrazolio	33
Patrones de tinción	34
CONCLUSIONES	40

BIBLIOGRAFÍA	40
CAPÍTULO IV. GERMINACIÓN	42
INTRODUCCIÓN	42
OBJETIVO.....	50
MATERIALES Y MÉTODOS	50
Evaluación de la calidad fisiológica (germinación).....	50
Diseño experimental y análisis estadístico	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
Germinación.....	57
<i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Texas’. Sin almacenamiento.....	58
<i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Biloela’. Sin almacenamiento.....	61
<i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Texas’ con 3 meses de almacenamiento	67
<i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Biloela’ con 3 meses de almacenamiento.....	71
<i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Texas’ con 6 meses de almacenamiento	75
<i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Biloela’ con 6 meses de almacenamiento.....	78
<i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Texas’ con 9 meses de almacenamiento	82
<i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Biloela’ con 9 meses de almacenamiento.....	85
CONCLUSIONES	93
BIBLIOGRAFÍA	94
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES.....	98
PROPUESTA METODOLÓGICA.....	98
Recepción de la muestra.....	98
Calidad física.....	98
Viabilidad por tetrazolio	99
Germinación.....	101
FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	103
ANEXO I. ESTÁNDAR DE COMERCIALIZACIÓN DE ESPECIES FORRAJERAS SUBTROPICALES (INASE).....	104
ANEXO II. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	106

LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Número de fascículos llenos y vacíos y número de cariósides contenidos en <i>Cenchrus ciliaris</i> 'Texas' utilizado en los ensayos de calidad física.....	17
Tabla 2.2 Estimación por intervalos de confianza (95%). para la proporción media de fascículos llenos y vacíos en <i>Cenchrus ciliaris</i> 'Texas'.....	18
Tabla 4.1 Combinación de alternativas de preparación de semillas y de pretratamientos utilizados en los ensayos de germinación de <i>Cenchrus ciliaris</i> 'Texas' y 'Biloela'. F : fascículos; FE : fascículos escarificados; C : cariósides; CE : cariósides escarificadas.....	54

LISTA DE FIGURAS

Fig. 2.1 A) Fascículos de <i>Cenchrus ciliaris</i> acompañados de restos vegetales. B) Cariópsides desnudas.....	15
Fig. 2.2 Proporciones acumuladas de fascículos según el número de cariópsides extraídos por fascículo (Ic: 1 cariópside; IIc: 2 cariópsides; IIIc: 3 cariópsides) en <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Texas’ (n=100 fascículos en cada repetición).....	19
Fig. 3.1 Tratamientos de cortes realizados en las cariópsides de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Texas’. La zona de corte se muestra con línea punteada. A) Testigo (sin cortar); B) Corte longitudinal incompleto; C) Corte longitudinal completo; D) Corte transversal completo.....	28
Fig. 3.2 Porcentaje de semillas viables de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Texas’ comparando distintos tratamientos de cortes de cariópsides. Letras iguales indica la no existencia de diferencias significativas entre los tratamientos (Fisher $p < 0,05$).....	31
Fig. 3.3 Porcentaje de semillas viables y no viables de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Texas’ en distintos tratamientos de cortes de cariópsides.	31
Fig. 3.4 Porcentaje de viabilidad de semillas de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Texas’ sometidas a diferentes concentraciones de tetrazolio y tiempos de tinción. Letras iguales indican que no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Fisher $p < 0,05$).....	33
Fig. 3.5 Cariópside viable de <i>Cenchrus ciliaris</i> completamente teñido con tetrazolio. Con línea punteada se resaltan áreas esenciales para la evaluación de viabilidad.....	36
Fig. 3.6 Cariópsides viables con defectos de <i>Cenchrus ciliaris</i> luego de la tinción con tetrazolio. A) Escutelo con extremo superior menor o igual a 1/3 sin teñir o necrosado. B) Escutelo con extremos superior e inferior menor o igual a 1/3 sin teñir o necrosado. C) Coleorriza sin teñir o necrosada.	37
Fig. 3.7 Cariópsides no viables de <i>Cenchrus ciliaris</i> luego de la tinción con tetrazolio. A) Coleorriza y radícula sin teñir o necrosada. B) Extremo coleoptilo sin teñir o necrosado. C) Mesocótilo sin teñir o necrosado. D) Escutelo banda unión con mesocótilo sin teñir o necrosado.....	38

Fig. 3.8 Cariópside no viable de <i>Cenchrus ciliaris</i> luego de la tinción con tetrazolio	39
Fig. 4.1 Alternativas de preparación de semillas para la germinación de <i>Cenchrus ciliaris</i> A) fascículo intacto B) fascículo escarificado C) cariópside intacta D) cariópside escarificada. Con línea punteada se indica el sitio de corte (fascículos) y el sitio de punción (cariópsides).	52
Fig. 4.2 A) Corte transversal realizado en fascículo de <i>Cenchrus ciliaris</i> a) estructuras de protección del involucro (setas); b) glumas, lemmas y páleas; c) cariópside. B) espiguilla luego de ser retiradas las estructuras que forman el involucro. C) Fascículo escarificado de <i>Cenchrus ciliaris</i> . Con circunferencia verde se destaca el sitio de corte realizado con bisturí en la región basal del fascículo.	52
Fig. 4.3 Porcentaje de germinación en <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Texas ’ sin almacenamiento para las combinaciones de materiales y tratamientos utilizados. Líneas de colores muestran materiales. C: cariópsides (rojo); CE: cariópsides escarificadas (azul); F: fascículos (amarillo); FE: fascículos escarificados (verde) y con círculos los tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). En cada día de evaluación letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). ...	59
Fig. 4.4 Grupos de germinación formados al día 28 por distintos tipos de materiales de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Texas ’ sin almacenamiento. C: cariópsides (rojo); CE: cariópsides escarificadas (azul); F: fascículos (amarillo); FE: fascículos escarificados (verde) y la aplicación en ellos de tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	60
Fig. 4.5 Curvas de germinación promedio para materiales de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Texas ’ sin almacenamiento sometidos a diferentes tratamientos pregerminativos.....	61
Fig. 4.6 Porcentaje de germinación en <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Biloela ’ sin almacenamiento para las combinaciones de materiales y tratamientos utilizados. Líneas de colores muestran materiales. C: cariópsides (rojo); CE: cariópsides escarificados (azul); F: fascículos (amarillo); FE: fascículos escarificados (verde) y con círculos los tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). En cada día de evaluación letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$). ...	63

Fig. 4.7 Grupos de germinación formados al día 28 por distintos tipos de materiales de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Biloela ’ sin almacenamiento. C : carióspsides (rojo); CE : carióspsides escarificadas (azul); F : fascículos (amarillo); FE : fascículos escarificados (verde) y la aplicación en ellos de tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	64
Fig. 4.8. Curvas de germinación promedio para materiales de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Biloela ’ sin almacenamiento sometidos a diferentes tratamientos pregerminativos.....	65
Fig. 4.9 Diferencia promedio respecto a la germinación alcanzable de distintos tratamientos germinativos aplicados a semillas de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Texas ’ y ‘ Biloela ’. Sin almacenamiento.....	67
Fig. 4.10 Porcentaje de germinación en <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Texas ’ con tres meses de almacenamiento para las combinaciones de materiales y tratamientos utilizados. Líneas de colores muestran materiales. C : carióspsides (rojo); CE : carióspsides escarificadas (azul); F : fascículos (amarillo); FE : fascículos escarificados (verde) y con círculos los tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). En cada día de evaluación letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	69
Fig. 4.11 Grupos de germinación formados al día 28 por distintos tipos de materiales de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Texas ’ con tres meses de almacenamiento. C : carióspsides (rojo); CE : carióspsides escarificadas (azul); F : fascículos (amarillo); FE : fascículos escarificados (verde) y la aplicación en ellos de tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	70
Fig. 4.12 Curvas de germinación promedio para materiales de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Texas ’ con tres meses de almacenamiento sometidos a diferentes tratamientos pregerminativos.....	71
Fig. 4.13 Porcentaje de germinación en <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Biloela ’ con tres meses de almacenamiento para las combinaciones de materiales y tratamientos utilizados. Líneas de colores muestran materiales. C : carióspsides (rojo); CE : carióspsides escarificadas (azul); F : fascículos (amarillo); FE : fascículos escarificados (verde) y con círculos los tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y	

ácido giberélico). En cada día de evaluación letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	72
Fig. 4.14 Grupos de germinación formados al día 28 por distintos tipos de materiales de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Biloela ’ con tres meses de almacenamiento. C : cariósides (rojo); CE : cariósides escarificadas (azul); F : fascículos (amarillo); FE : fascículos escarificados (verde) y la aplicación en ellos de tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	73
Fig. 4.15 Curvas de germinación promedio para materiales de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Biloela ’ con tres meses de almacenamiento sometidos a diferentes tratamientos pregerminativos.....	74
Fig. 4.16 Diferencia promedio respecto a la germinación alcanzable de distintos tratamientos germinativos aplicados a semillas de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Texas ’ y ‘ Biloela ’. 3 meses de almacenamiento.	74
Fig. 4.17 Porcentaje de germinación en <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Texas ’ con seis meses de almacenamiento para las combinaciones de materiales y tratamientos utilizados. Líneas de colores muestran materiales. C : cariósides (rojo); CE : cariósides escarificadas (azul); F : fascículos (amarillo); FE : fascículos escarificados (verde) y con círculos los tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). En cada día de evaluación letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	76
Fig. 4.18 Grupos de germinación formados al día 28 por distintos tipos de materiales de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Texas ’ con seis meses de almacenamiento. C : cariósides (rojo); CE : cariósides escarificadas (azul); F : fascículos (amarillo); FE : fascículos escarificados (verde) y la aplicación en ellos de tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	77
Fig. 4.19 Curvas de germinación promedio para materiales de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Texas ’ con seis meses de almacenamiento sometidos a diferentes tratamientos pregerminativos.....	78

Fig. 4.20 Porcentaje de germinación en <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Biloela ’ con seis meses de almacenamiento para las combinaciones de materiales y tratamientos utilizados. Líneas de colores muestran materiales. C : cariósides (rojo); CE : cariósides escarificadas (azul); F : fascículos (amarillo); FE : fascículos escarificados (verde) y con círculos los tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). En cada día de evaluación letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	79
Fig. 4.21 Grupos de germinación formados al día 28 por distintos tipos de materiales de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Biloela ’ con seis meses de almacenamiento. C : cariósides (rojo); CE : cariósides escarificadas (azul); F : fascículos (amarillo); FE : fascículos escarificados (verde) y la aplicación en ellos de tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	80
Fig. 4.22 Curvas de germinación promedio para materiales de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Biloela ’ con seis meses de almacenamiento sometidos a diferentes tratamientos pregerminativos.....	81
Fig. 4.23 Diferencia promedio respecto a la germinación alcanzable de distintos tratamientos germinativos aplicados a semillas de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Texas ’ y ‘ Biloela ’. 6 meses de almacenamiento.	81
Fig. 4.24 Porcentaje de germinación en <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Texas ’ con nueve meses de almacenamiento para las combinaciones de materiales y tratamientos utilizados. Líneas de colores muestran materiales. C : cariósides (rojo); CE : cariósides escarificadas (azul); F : fascículos (amarillo); FE : fascículos escarificados (verde) y con círculos los tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). En cada día de evaluación letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	83
Fig. 4.25 Grupos de germinación formados al día 28 por distintos tipos de materiales de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘ Texas ’ con nueve meses de almacenamiento. C : cariósides (rojo); CE : cariósides escarificadas (azul); F : fascículos (amarillo); FE : fascículos escarificados (verde) y la aplicación en ellos de tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	84

Fig. 4.26 Curvas de germinación promedio para materiales de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Texas’ con nueve meses de almacenamiento sometidos a diferentes tratamientos pregerminativos.....	85
Fig. 4.27 Porcentaje de germinación en <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Biloela’ con nueve meses de almacenamiento para las combinaciones de materiales y tratamientos utilizados. Líneas de colores muestran materiales. C : cariósides (rojo); CE : cariósides escarificadas (azul); F : fascículos (amarillo); FE : fascículos escarificados (verde) y con círculos los tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). En cada día de evaluación letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	86
Fig. 4.28 Grupos de germinación formados al día 28 por distintos tipos de materiales de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Biloela’ con nueve meses de almacenamiento. C : cariósides (rojo); CE : cariósides escarificadas (azul); F : fascículos (amarillo); FE : fascículos escarificados (verde) y la aplicación en ellos de tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).	87
Fig. 4.29 Curvas de germinación promedio para materiales de <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Biloela’ con nueve meses de almacenamiento sometidos a diferentes tratamientos pregerminativos.....	88
Fig. 4.30 Diferencia promedio respecto a la germinación alcanzable de los distintos materiales utilizados como semillas en <i>Cenchrus ciliaris</i> ‘Texas’ y ‘Biloela’. 9 meses de almacenamiento.....	89
Fig. 5.1 Mapa conceptual que describe la metodología para la evaluación de la calidad física, viabilidad por tetrazolio y germinación en <i>Cenchrus ciliaris</i>	102

LISTA DE ABREVIATURAS Y/O SÍMBOLOS

AG ₃	Ácido Giberélico
C	Cariópsides
CE	Cariópsides escarificados
cm	Centímetro
°C	Grados centígrados
F	Fascículos
FE	Fascículos escarificados
gr	Gramo/s
h	Hora/s
kg	Kilogramo/s
ml	Mililitro/s
mm	Milímetro/s
KNO ₃	Nitrato de Potasio
PG	Poder germinativo
PSD	Definición de Semilla Pura
%	Porcentaje
TZ	Tetrazolio

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La ganadería constituye uno de los principales sistemas de producción agropecuaria de la República Argentina. En las últimas décadas, el proceso de agriculturización ha desplazado la frontera ganadera hacia sitios marginales para dar lugar a la producción de soja (Reartes, 2004). Dicho proceso fue notorio en el norte de la Provincia de Córdoba, donde predominaba la cría de ganado bovino y caprino en pasturas naturales y montes, lo cual promovió la acción conjunta de campesinos, organizaciones y programas gubernamentales para llevar a cabo acciones tendientes a aumentar la productividad de las pasturas, mejorando la oferta forrajera en los períodos críticos de déficit de forrajes. Entre las principales acciones se destaca la implantación de pasturas megatérmicas tales como Buffel Grass (*Cenchrus ciliaris* L.) y Gatton Panic (*Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K. Simon & S.W.L. Jacobs ex *Panicum maximum* Jacq.) (Cáceres *et al.*, 2009). El uso de especies forrajeras exóticas se propone como complemento y soporte para recuperar los pastos nativos y no como sustitución de los mismos. Dar descansos estratégicos al pastizal natural, dejándolo acumular reservas y permitiendo la producción de semillas de las especies herbáceas nativas, favorece su recuperación (Rossi, 2005).

Estudios realizados en nuestro país han demostrado que gramíneas megatérmicas perennes introducidas, como *Cenchrus ciliaris*, *Chloris gayana* Kunth y *Megathyrsus maximus* pueden duplicar o triplicar la cantidad de forraje producido respecto de los pastizales naturales (Ayerza, 1981; Pérez, 2005), por lo cual constituyen un recurso forrajero de importancia.

La calidad de las semillas es una limitante al momento de realizar la siembra para la implantación de una pastura, por lo que conocer los atributos de calidad es indispensable para alcanzar la productividad deseada (FAO, 2006). La calidad en semillas de pastos es sumamente variable y frecuentemente está asociada con la inmadurez, la dormición y el deterioro que ocurre en el almacenamiento (Clements y Cameron, 1980).

Según Popinigis (1974) la calidad de la semilla está dada por la sumatoria de atributos genéticos, físicos, fisiológicos y sanitarios, los cuales afectan directamente

la capacidad de producir plantas con alto potencial productivo. El componente físico está referido a la pureza y a la condición física que poseen las semillas. La pureza está caracterizada por la proporción de los distintos componentes presentes en un lote, tales como: semilla pura, semillas extrañas y materia inerte. Se evalúa mediante la determinación de pureza indicada en las Reglas Internacionales de Análisis de Semillas (ISTA, 2012) para diferentes especies. La condición física mide características relacionadas con el contenido de humedad, peso, color, daño mecánico, entre otros.

Al realizar un análisis de pureza en pastos, además de la típica separación de los componentes que forman la muestra de trabajo, surge el problema de las determinaciones extras debido a la existencia de estructuras que acompañan las semillas. Además, la determinación de la presencia de un cariósido, la remoción de flores estériles y de semillas vanas no es una tarea fácil en algunas especies tropicales como *Cenchrus*, *Brachiaria*, *Megathyrus* y *Paspalum* (Chin, 1994).

La calidad fisiológica está representada por la capacidad de las semillas para desempeñar funciones vitales y puede ser evaluada mediante la germinación, la viabilidad, el vigor y la longevidad.

La germinación de las semillas puede ser afectada por factores tanto intrínsecos como extrínsecos. Entre los primeros se pueden mencionar la viabilidad y el vigor, y dentro de los segundos, a aquellos factores del medio que rodean a las semillas tales como: agua, luz, temperatura, gases y compuestos de origen orgánicos e inorgánicos (Bewley y Black, 1994). Según Baskin y Baskin (1989) una semilla que no germina bajo ningún tipo de condición ambiental normal, es una semilla durmiente. Dado que en las especies de pastos es muy común encontrar semillas con latencia, siendo muy diversos los factores que la afectan, Faessler y Apfelbaum (1988), Vankus (1997) y Mueller *et al.* (2000) señalaron que, como complemento a los análisis clásicos de germinación, la evaluación de la viabilidad es muy eficiente para determinar cuántas plántulas normales y cuántas semillas con dormición pueden tener un lote de semillas.

La dormición de las semillas es uno de los aspectos más estudiados por los científicos y uno de los más complejos de determinar debido a los diferentes aspectos que la condicionan, ya sean propios de las semillas o del ambiente que las rodea. La

dormición tiene gran importancia en la adaptación de los pastos a sus hábitats naturales y es un estado común en las semillas de especies utilizadas como pasturas en todo el mundo, tanto de climas tropicales como subtropicales y templados (Simpson, 1990). Es uno de los principales mecanismos que poseen y que garantiza su supervivencia y perpetuación, relacionándose a la duración del ciclo de vida y a la rusticidad (McIvor y Howden, 2000).

Baskin y Baskin (2004) agruparon la dormición en cinco clases: dormición fisiológica, morfológica, morfo-fisiológica, física y combinada (dormición física y dormición fisiológica). Dentro de cada clase, puede haber diferentes niveles y tipos de dormición. Otra forma de clasificarla, es según el tiempo en la cual es establecida. De esta manera, cuando está presente al formarse la semilla, se puede hablar de dormición primaria o innata y si es causada por alguna condición del ambiente en particular, se denomina dormición secundaria o impuesta (Benech-Arnold *et al.*, 2000).

Entre las especies megatérmicas más utilizadas para forrajes en nuestro país se encuentra *Cenchrus ciliaris* (Sin. *Pennisetum ciliare* (L.) Link.) comúnmente llamado “Buffel Grass”, “Pasto Salinas”, “Zacate Buffel”, “Capim-Búfel”. Es una especie perenne introducida, perteneciente a la familia Poaceae, subfamilia Panicoideae, tribu Paniceae. Las plantas son cortamente rizomatosas; cañas decumbentes a erectas de 30 a 90 cm de alto y 2 - 2,5 cm de diámetro; entrenudos de 5 a 10 cm de largo, herbáceos, glabros, los inferiores macizos; vainas de 6 a 11 cm de largo, hispídas a glabras, bordes membranáceos pestañosos a glabros; inflorescencia en panoja espiciforme lineal, densa, elipsoide, recta, pajiza, con tintes violáceos, de 5 - 11 x 1,5 - 2,5 cm considerando las setas; pedúnculos cilíndricos, filiformes, rectos, hasta 15 cm de largo; raquis de la panoja anguloso, longitudinalmente estriado, escabroso a hirsuto, no dispuesto en zig-zag; involucreo con 20 a 35 setas levemente soldadas entre sí sólo en la base, constituyendo la concrecencia un disco igual o mayor a 1 mm de diámetro, setas dispuestas en 2 series, la externa con anillo de setas escabrosas, más cortas y finas que las internas, setas densamente ciliadas en la porción media basal, con dentículos antrorsos, rígidas, cilíndricas y gruesas, de 6 - 10 mm de largo (hasta 5 mm más largas que las espiguillas), con una seta mayor que las restantes, de 10 - 15 mm de largo. Espiguillas ovalo-lanceoladas, dispuestas en grupos de 2 - 3 por involucreo,

glabras, sólo escabrosas hacia el ápice, de 2,5 - 4,5 x 1 - 1,2 mm, sésiles, 2-floras, con el antecio inferior generalmente neutro y el superior perfecto, base de la espiguilla con anillo de pelos cortos; gluma inferior ovado-acuminada, membranácea, de 1,5 - 2,5 mm de largo, 1-nervia, de ápice agudo, abrazadora; gluma superior membranácea, subigual a la gluma inferior, de 2 - 3 mm de largo, 1-3-nervia, nervaduras laterales difusas, de ápice agudo; lemma inferior lanceolada, glumiforme, de 3,5 - 5 x 1,5 - 2 mm, 5-7-nervia, nervaduras laterales difusas, de ápice agudo; pálea inferior ausente o presente, cuando presente menor a la lemma, de 2 - 4 mm de largo; lemma superior lanceolada, glabra, de 3,5 - 5 x 1,5 - 2 mm, 5-nervia, con las nervaduras difusas, de ápice agudo; pálea superior levemente menor que la lemma, de 3 - 4,5 mm de largo; estambres 3, anteras de 1,5 - 2,5 mm de largo, de ápice glabro, con filamentos estaminales a veces exertos; gineceo con ramas estigmáticas exertas, de 2 - 3 mm de largo, estilos sólo soldados en la base; cariósipide ovoide, de 1 - 2 mm de largo (Anton y Zuloaga, 2017). Los principales cultivares utilizados en el subtrópico semiárido argentino son ‘Texas’, en la zona cálida seca, y ‘Biloela’ en la zona cálida semiárida y sub-húmeda (De León, 2010).

Cuando se determina la calidad fisiológica en Buffel Grass siguiendo los protocolos existentes, las mayores dificultades que se presentan son los bajos porcentajes de germinación que no reflejan el potencial real del material. La dormición en las semillas de Buffel Grass, es una de las razones principales de la baja germinación en esta especie (Sharif-Zadeh y Murdoch, 2000). La etapa de dormición está determinada por un tiempo comprendido entre los 16 a los 20 meses desde la cosecha y se considera que la germinación aumenta con el tiempo de almacenamiento (Namur *et al.*, 2014). Además, la ausencia de protocolos de viabilidad para *Cenchrus ciliaris* en las reglas ISTA (2012) y las directrices dadas como referencias en las Hojas de Trabajo de la Prueba de Tetrazolio (ISTA, 2003) conducen a confusión en el momento de la comercialización y en la siembra.

En la determinación de la calidad de semillas en *Cenchrus ciliaris* siguiendo los protocolos existentes, se pueden identificar los siguientes inconvenientes:

- Dificultad para interpretar los resultados en la determinación de la calidad física (Semilla Pura), a causa de que la pureza descrita por las reglas ISTA

(2012) no discrimina el porcentaje de fascículos que contienen carióspsides en una muestra de semillas.

- Ausencia de protocolos para los procedimientos en los ensayos de viabilidad por tetrazolio, en las normas ISTA (2012).
- Dificultad en la evaluación de la calidad fisiológica (germinación) ya que la metodología propuesta por ISTA (2012) no expresa la calidad real del lote. Esto se debe a un alto porcentaje de semillas durmientes, según el momento de realización del análisis.

Los problemas antes descritos llevan a una inexacta definición de la calidad de semillas, lo cual trae inconvenientes al momento de la comercialización y siembra de la pastura.

HIPÓTESIS

La aplicación de un nuevo método de análisis, alternativo al utilizado por ISTA, respecto a la pureza del material, la viabilidad por tetrazolio y las condiciones de germinación, permitirá determinar de manera más precisa la calidad de semillas de Buffel Grass (*Cenchrus ciliaris* L.).

OBJETIVO GENERAL

Elaborar un nuevo método de análisis para determinar la calidad de semillas de *Cenchrus ciliaris* que considere aspectos relacionados tanto a la calidad física (Pureza) como a la calidad fisiológica (Viabilidad y Germinación).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1-Determinar los parámetros para expresar la calidad física a partir de la cual se obtendrá material adecuado para los ensayos de viabilidad y germinación, comprendiendo:

- a- la relación porcentual de fascículos llenos respecto al total de semilla pura.
- b- el promedio del número de cariósides presentes por fascículo.
- c- el peso de 1000 fascículos.

2- Establecer especificaciones para realizar la prueba de viabilidad por tetrazolio utilizando los protocolos de *Panicum* (ISTA, 2012) aplicadas a *Cenchrus ciliaris*. Evaluar la tinción de las cariósides en relación a:

- a- Preparación del material (tipos de cortes de cariósides).
- b- Concentración de la solución de tetrazolio.
- c- Tiempos de tinción.
- d- Elaboración de patrones de tinción.

3- Determinar una metodología para la prueba de germinación que mejor exprese la calidad fisiológica en semillas de *Cenchrus ciliaris* de los cultivares ‘Texas’ y ‘Biloela’ considerando las siguientes alternativas:

- a- Determinar tratamientos de preparación de las semillas.
- b- Determinar tratamientos para evaluar la evolución de la dormición a través del tiempo y la ruptura de la misma.

BIBLIOGRAFÍA

- Anton A. M. y Zuloaga F.O. Flora Argentina. 2017. Catálogo de plantas vasculares del Conosur. Publicado en Internet, disponible en <http://www.floraargentina.edu.ar/>. Activo agosto 2017.
- Ayerza R. 1981. El Buffel Grass: utilidad y manejo de una promisorio gramínea. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina, 139 pp.
- Baskin J.M. and Baskin C.C. 1989. Physiology of Dormancy and Germination in Relation to seed Bank Ecology. En: Ecology Soil Seed Bank. Academic Press, Inc. San Diego. California. pp 53-66.
- Baskin J.M. and Baskin C.C. 2004. A classification system for seed dormancy. Seed Science Research. 14: 1-16.
- Benech-Arnold R.L., Sánchez R.A., Forcella F., Krurk B.C. y Ghera C.M. 2000. Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. Field Crops Research. 67: 105-122.
- Bewley J.D. and Black M. 1994. Dormancy and the control of germination. Seeds of development and germination. Ed. Plenum Press. New York and London. pp. 199-271.
- Cáceres D., Silvetti F., Ferrer G., Soto G. y Bisio C. 2009. Agriculturización y estrategias campesinas en el norte de la provincia de Córdoba. Publicado en internet, disponible en <http://agro.unc.edu.ar/~extrural/Caceres.pdf>. Activo junio 2017.
- Chin H.F. 1994. Storage and testing of forage seeds in the tropics. Publicado en internet, disponible en www.fao.org/ag/Agp/AGPC/doc/publicat/GRASSLAN/151.pdf Activo junio 2017.
- Clements R.J. and Cameron D.J. 1980. Collecting and Testing Tropical Forage Plants. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Melbourne, Australia. 154 pp.
- De León M. 2010. Megatérmicas para mejorar la ganadería subtropical. Adaptación y utilización de megatérmicas para aumentar la productividad de los sistemas ganaderos en la región subtropical semiárida del país. Publicado en internet,

- disponible en www.aapresid.org.ar/wpcontent/uploads/2013/03/PGSD10_007.pdf. Activo junio 2017.
- Faessler F. and Apfelbaum S. 1988. Large scale harvesting of prairie seed. Restoration and Management Notes 6(2):79-80
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO. 2006. Publicado en internet, disponible en www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/seeds-pgr/seed_sys/quality/en/. Activo mayo 2017.
- ISTA. 2003. International Seed Testing Association. Working Sheets on Tetrazolium Testing. Volume 1. Zürich
- ISTA. 2012. International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing. Seed science and Technology 31, Supplement. Zürich
- McIvor J.G. and Howden S.M. 2000. Dormancy and germination characteristics of herbaceous species in the seasonally dry tropics of northern Australia. Austr. Ecol., v. 25, n 3, pp. 214-222.
- Mueller J.P., Hall T.S., Spears J.F. and Penny B.P. 2000. Winter Establishment of Eastern Gama grass in the Southern Piedmont. Agronomy Journal 92: 1184-1188.
- Namur P.T., Tessi J., Avila R.E., Rettore, H.A., y Ferrando C.A. 2014. Buffel Grass: Generalidades, implantación y manejo para recuperación de áreas degradadas. Estación Experimental Agropecuaria La Rioja. INTA, 18pp.
- Pérez H. 2005. Características de las especies forrajeras adaptadas a las condiciones del Noroeste del país. Forrajes 2005. Seminario técnico. Hotel Holiday Inc. Córdoba. Argentina.
- Popinigis F. 1974. Qualidades de sementes. Lavoura arrozeira, Porto Alegre. Instituto Rio. Grandese do arroz, 282: 14-8.
- Reartes D. 2004. Situación de la ganadería argentina. En INTA expone 2004 en la pampa húmeda. En la página web http://www.inta.gov.ar/balcarce/noticias/inta_expone/AuditorioCarlosLSaubidet/SituacGanad.pdf. Consulta 18/08/2006

- Rossi C. 2005. Utilización del “Buffel Grass” (*Cenchrus ciliaris* L.) para la recuperación de pastizales degradados de la región árida subtropical. Sitio Argentino de producción animal. Publicado en internet, disponible en www.produccionanimal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas_cultivadas_megatermicas/34-buffel_grass_en_chaco_arido_argentino.pdf. Activo febrero 2014.
- Simpson G.M. 1990. Seed dormancy in grasses. Department of Crop Science and Plant Ecology. University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada. 297 pp.
- Sharif-Zadeh F. and Murdoch A. J. 2000. The effects of different maturation conditions on seed dormancy and germination of *Cenchrus ciliaris*. Seed Science Research. 10:147-157.
- Vankus V. 1997. The Tetrazolium Estimated Viability Test for Seeds of Native Plants. In: Landis TD, Thompson JR.: (tech coords.). National Proceedings, Forest and Conservation Nursey Associations. Gen. Tech. Rep. PNW-GRT-419. Portland, OR: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Pacific Northwest Research Station: 57-62. Publicado en internet, disponible en <http://fcnanet.org/proceedings/1997/vankus.pdf>. Activo agosto 2017.

CAPÍTULO II. CALIDAD FÍSICA

INTRODUCCIÓN

En el marco de la calidad física de las semillas, el análisis de pureza tiene como objetivo determinar la proporción en peso de los distintos componentes que posee la muestra examinada, expresados en porcentaje, y de la inferencia que tienen estos en la composición del lote. En un típico análisis de pureza tres componentes son identificados: la fracción de semilla pura, las semillas de otras especies distintas a la semilla pura u extrañas y la materia inerte (ISTA, 2012).

Según FAO (2006) los principales parámetros para determinar la calidad de las semillas son la pureza física y el poder germinativo. La pureza física no sólo refleja el grado de limpieza de un cultivo, sino además, brinda pautas acerca de la eficiencia con la que se realizó el procesamiento de las semillas (Carambula, 1984).

En los protocolos de análisis de las Reglas Internacionales de Análisis de Semillas (ISTA, 2012) y en el Manual de Evaluación de Plántulas de (ISTA, 2009) no hay una distinción entre semillas en sentido botánico y entre las estructuras de dispersión, por lo que en cuantiosas especies, entre ellas *Cenchrus ciliaris*, se considera semilla desde el punto de vista agronómico a las estructuras de dispersión que las mismas poseen.

El propágulo o unidad de dispersión de *Cenchrus ciliaris* es el fascículo, el cual consta de uno o más fruto/s, botánicamente denominadas cariósides por ser inseparables de las semillas, que se encuentran encerradas entre glumas, lemma y pálea conformando la espiguilla, éstas a su vez están rodeadas por setas o cerdas (Parihar y Pathak, 2006). Clayton (1990) determinó que la función principal que realizan las cubiertas envolventes es la de protección contra la infección, la predación y la desecación.

En pasturas tropicales la fenología floral, los potenciales de producción de semillas y la pureza de las semillas, es reflejada en el porcentaje de semillas en las espiguillas (Ferguson *et al.*, 1983).

La fracción de semilla pura para *Cenchrus ciliaris* está caracterizada en las reglas ISTA (2012) en el Capítulo 3. Definición de Semilla Pura (PSD) N° 43 C (vestidas) e incluye a las siguientes definiciones:

- “Fascículo de 1 a 5 espiguillas, compuesto de glumas, lemma y pálea encerrando una cariósida, y lemma estéril unida”.
- “Flor, con lemma y pálea encerrando una cariósida”.
- “Cariósida”.
- “Fragmento de cariósida cuyo tamaño sea superior a la mitad de su tamaño original”.
- **“Fascículos con o sin cariósidas formadas en su interior”.**

Por lo tanto, al realizar el análisis de pureza y teniendo en cuenta la última definición dada por las reglas, no es obligatorio chequear la presencia de cariósidas en los fascículos; de tal manera, que un fascículo sin cariósida (vano) es considerado semilla pura.

El grado de formación de cariósidas en las espiguillas de pastos es susceptible a las condiciones ambientales prevalecientes durante el período de antesis y formación de las semillas (Humphreys y Riveros, 1986). Por ello, en muchas especies una proporción variable de espiguillas permanecen vacías o vanas debido a la baja formación de cariósidas resultando en una pobre germinación (Crowder y Chheda, 1982; Boonman, 1993). Song *et al.* (2007), al trabajar en *Cenchrus ciliaris* determinaron que el potencial de germinación estuvo limitado a causa del alto porcentaje de semillas vanas encontradas en la muestra analizada. Los factores genéticos también pueden modificar el número de cariósidas por fascículo alterando el porcentaje de germinación y la dormición (Hacker y Ratcliff, 1989).

La remoción de flores estériles y de semillas vanas no es tarea fácil en especies tropicales como *Cenchrus*, *Brachiaria*, *Megathyrsus* y *Paspalum* principalmente por la exigua contribución del peso de las cariósidas en el peso total de las estructuras que lo forman (Chin, 1994). Ateca (1997), experimentando con *Megathyrsus maximus* Jacq. ‘Gatton Panic’, propuso no chequear la presencia de cariósida a causa

de la dificultad en la evaluación y la consecuente disparidad dada entre los resultados obtenidos por parte de los laboratorios.

Khalil *et al.* (2002) utilizaron índices para la descripción de rasgos relacionados a la producción de semillas, uno de ellos fue la fertilidad de las panojas que consideraba el número de fascículos fértiles por panoja en relación al número total de fascículos por panoja.

Los resultados de pureza incluyendo los fascículos que contengan una carióspside pueden ajustarse, según Chin (1994), por el porcentaje de germinación y de esta manera obtener las semillas puras germinables en porcentaje.

Diversos autores (Evers *et al.*, 1969; Yadav *et al.*, 1974; Hacker y Ratcliff, 1989; Nefatti, 1994) al estudiar los rasgos característicos en *Cenchrus ciliaris* registraron el número de carióspsides contenidos en cada fascículo y observaron gran variabilidad en el número de carióspsides extraídas. En general, los pastos poseen sólo un (1) carióspside en cada unidad de dispersión, mientras que en *Cenchrus ciliaris* han sido reportados hasta más de cinco (Pandeya y Jayan, 1978; Parihar *et al.*, 1984 a, b).

Silcock y Smith (1990) trabajando con semillas de pasturas determinaron el porcentaje de semillas llenas en Buffel Grass, valor que fue tomado como referencia en los ensayos de germinación que posteriormente realizaron. Otros como Whyte *et al.* (1959), Bogdan (1977), Chakravarty *et al.* (1970) y Khalil *et al.* (2002) utilizaron el peso de mil fascículos para caracterizar botánica y fenotípicamente la especie.

Estudios realizados por Parihar y Pathak (2006) en pastos tropicales han demostrado que en *Cenchrus ciliaris* y *Cenchrus setigerus* Vahl el peso de los carióspsides en relación al peso total de los fascículos fue muy bajo, no llegando al 50 %.

La principal utilidad del peso de 1000 semillas es calcular la densidad de siembra y se determina sobre la semilla pura, de acuerdo a la definición de la misma. Cuando se realiza la determinación de pureza siguiendo las reglas ISTA, al no discriminar en ésta el porcentaje de fascículos llenos (que contienen carióspside en su interior), la misma no representa el porcentaje real de semillas y por lo tanto se está incluyendo en dicho peso una cantidad de fascículos que son vanos o vacíos.

De acuerdo a lo expresado y considerando la variabilidad existente en parámetros concernientes a la calidad física de semillas de *Cenchrus ciliaris* es de interés determinar la calidad física en base a características de las unidades de dispersión de la especie.

OBJETIVOS

1- Determinar como expresión de la calidad física en *Cenchrus ciliaris*, las estimaciones de:

- a- la relación porcentual de fascículos llenos respecto al total de semilla pura.
- b- el promedio del número de cariósides presentes por fascículo.
- c- el peso de 1000 fascículos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Análisis de Semillas, Investigación, Docencia y Servicios (L.A.S.I.D.Y.S.) de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.

El material analizado provino de una muestra de *Cenchrus ciliaris* 'Texas' ingresada al laboratorio en el mes de julio del año 2013 para su respectivo análisis de rutina. Se almacenó en bolsas de papel a una temperatura entre 20 y 25 °C hasta su posterior uso en los ensayos. Los procedimientos y metodologías del presente capítulo fueron utilizados como referencia y para integrar los resultados en los capítulos de viabilidad y germinación.

Determinación de fascículos llenos y vacíos

El primer ensayo consistió en la determinación porcentual de fascículos llenos (con carióspside/s) y vacíos (sin carióspside/s) que se encontraba en el material. Esto se logró mediante la apertura y revisión de cada uno de los fascículos. La técnica se aplicó sobre la fracción de semilla pura, según lo indicado en el capítulo 3 de pureza de ISTA (2012) para esta especie. Por medio de la homogeneización y reducción del material disponible se obtuvieron al azar 4 repeticiones de 100 fascículos cada una. La metodología recomendada por ISTA (2012) para la homogeneización de los materiales compuestos por restos vegetales o brozados es el uso del cuarteo u octaneo. Dicha técnica es generalmente utilizada en especies donde otros métodos de división u homogeneización son difíciles, complicados o imposibles de realizar, como es el caso de *Andropogon*, *Brachiaria*, *Cenchrus*, *Chloris*, *Digitaria*, *Echinochloa*, *Eragrostis*, entre otros.

En cada repetición, la separación de las carióspsides se realizó de forma manual retirando las setas que forman el involucro y dejando expuestas las espiguillas, luego con la simple acción de fricción con las yemas de los dedos se liberaron la/las carióspsides contenidas en ellas. En la figura 2.1 se puede observar el material antes (Fig. 2.1.A) y después de extraer las carióspsides (Fig. 2.1.B).

Se registraron como “llenos” los fascículos que contenían por lo menos una (1) carióspside y como “vacíos” o “vanos” los fascículos donde no se encontró ninguna carióspside. Se determinaron los porcentajes de fascículos llenos y vacíos en cada repetición con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ fascículos llenos: } \frac{\text{N}^\circ \text{ de fascículos con carióspside}}{\text{N}^\circ \text{ fascículos examinados}} \times 100$$



Fig. 2.1 A) Fascículos de *Cenchrus ciliaris* acompañados de restos vegetales. B) Cariópsides desnudas.

Número medio de cariópsides presentes por fascículo

Utilizando el procedimiento de extracción de cariópsides antes descrito se registró el número de cariópsides contenidos en cada uno de los fascículos que formaron las cuatro repeticiones de 100 fascículos. De cada repetición se calculó la media del número de cariópsides contenidos por fascículo y con ésta la media general de cariópsides contenidos por fascículos mediante la siguiente fórmula.

$$\text{Promedio de cariópsides por fascículo: } \frac{N^{\circ} \text{ cariópsides totales}}{N^{\circ} \text{ fascículos examinados}}$$

Peso de 1000 fascículos

La determinación del peso de 1000 semillas fue realizada según los procedimientos descritos en las reglas ISTA (2012) utilizando la fracción de semilla pura. Las repeticiones fueron pesadas en balanza de precisión (10^{-4}) Mettler AE 160 según el número de cifras decimal indicado por las reglas internacionales.

Diseño experimental y análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2015) Facultad de Ciencias Agropecuarias. U.N.C.

En base al muestreo (4 repeticiones de 100 fascículos) se estimaron, por intervalos de confianza al 95 %, la proporción media de fascículos llenos y la proporción media de fascículos vacíos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados en la determinación de la relación entre fascículos llenos y vacíos demuestran que el 83 % de los fascículos examinados contuvo al menos una (1) cariósida dentro de sus estructuras. Por lo tanto, en nuestros estudios el porcentaje de fascículos fértiles o llenos podría asumir valores entre 0 y 100 % debido a que se consideró como fértil al fascículo que tenía al menos un cariósida. Con la misma forma de determinación, Silcock y Smith hallaron que un 60 % de los fascículos contenían cariósidas en su interior en los estudios que realizaron. A diferencia de Everes *et al.*, (1969) y de Khalil *et al.* (2002), quienes obtuvieron en algunos casos valores de fertilidad superiores al 100 %, resultado de computar el número total de cariósidas por fascículo. Lo que en sus ensayos indica indirectamente, que fascículos con más de un cariósida fueron encontrados.

La metodología adicional propuesta de calidad física realizando la apertura de espiguillas evidencia que, a pesar de que la totalidad de los fascículos utilizados son calificados como semilla pura en un ensayo de rutina utilizando las reglas ISTA, sólo un 83 % de ellos pueden germinar en caso de ser viables y de no presentar dormición. De igual manera, Crowder y Chheda (1982), Boonman (1993) y Song *et al.* (2007), trabajando con *Cenchrus ciliaris* observaron variabilidad en la proporción de fascículos vanos y éstos fueron condicionantes de los valores de germinación. La Tabla 2.1 muestra la cantidad de fascículos llenos y vacíos de cada repetición y el número de cariósidas contenidos por fascículo.

El porcentaje de fascículos llenos ofrece al analista un valor de referencia máxima que el material podría alcanzar si se hiciera determinación de viabilidad o de

germinación, esto es muy importante cuando se debe comercializar fascículos, ya que previo a realizar dichos análisis se puede conocer si la semilla alcanzará o no a los estándares de comercialización (Anexo I). De acuerdo a Song *et al.* (2007), tener en cuenta el porcentaje de semillas vanas al aplicar tratamientos germinativos es indispensable para concluir sobre los mejores métodos de ruptura de dormición.

Tabla 2.1 Número de fascículos llenos, vacíos y número de cariósides contenidos por fascículos en *Cenchrus ciliaris* ‘Texas’ utilizado en los ensayos de calidad física. (FL: fascículo; Ic: 1 cariósido; IIc: 2 cariósides; IIIc: 3 cariósides).

REPETICIÓN	FASCÍCULOS LLENOS	FASCÍCULOS VACÍOS	FASCÍCULOS SEGÚN N° DE CARIÓSIDES CONTENIDOS		
			FL Ic	FL IIc	FL IIIc
A	85	15	52	32	1
B	84	16	64	19	1
C	84	16	64	20	0
D	80	20	52	26	2
MEDIA	83	17	58	24	1

En contraste a los estudios realizados por Ateca (1997) para *Megathyrus maximus*, especie forrajera perteneciente a la misma tribu que *Cenchrus ciliaris*, en ésta última se puede sugerir la inspección individual de los fascículos debido a la importancia que esta cuantificación tiene para la especie y por la sencillez con la cuál puede ser realizada. Por otra parte, es importante indicar que la determinación de fascículos llenos surge como un método complementario al análisis de pureza y de esta manera no es necesaria la inspección de al menos 2500 fascículos o de 6 gr de material para su valoración (ISTA, 2012), lo cual hace al ensayo más fácil de adoptar por los laboratoristas.

Debido a la heterogeneidad del material estudiado, y tomando como referencia las reglas internacionales, fueron establecidos intervalos de confianza (95 %) para comparar los valores de cada una de las repeticiones. La tabla 2.2 brinda los intervalos de confianza entre las repeticiones de la determinación de porcentaje de fascículos llenos. De esta forma, se establece que la diferencia entre el resultado más alto (85 %)

y el más bajo (80 %) no excedió la tolerancia (tolerancia: 8 %), de esta forma los test son compatibles.

Tabla 2.2 Estimación por intervalos de confianza (95 %). para la proporción media de fascículos llenos y vacíos en *Cenchrus ciliaris* ‘Texas’.

Condición	Estimación (Media)	E.E.	n	LI (95%)	LS (95%)
Llenos	83	1,1	4	79	87
Vacíos	17	1,1	4	13	20

En la figura 2.2 se muestran las frecuencias relativas según el número de cariósides extraídas en cada fascículo de cada repetición. Se puede observar que del 83 % de fascículos caracterizados como “llenos” un 70 % tuvo un (1) cariósido encerrado en sus glumas, 29 % de la fracción tuvo dos (2) cariósides y un 1 %, tres (3) cariósides (Tabla 2.1). De esta forma, 438 cariósides fueron extraídas de 400 fascículos resultando un promedio de 1,095 cariósides por fascículo. Estudios indicando el número de cariósides por fascículos fueron realizados por Evers *et al.* (1969), Yadav *et al.* (1974), Nefatti, (1994) Pandeya y Jayan (1978), Parihar *et al.* (1984 a, b) y Hacker y Ratcliff (1989) registrando una gran variabilidad, entre 0,25 y hasta más de 5 cariósides por fascículo. A pesar de que el dato del número medio de cariósides contenidos por fascículos no es relevante desde el punto de vista del análisis de calidad establecido por las reglas ISTA, debido a la consideración de “semilla” como la unidad de dispersión de una especie, en este estudio es señalado como un indicador de la prolificidad del material, brindando mayor certeza de la calidad del lote al usuario de la semilla.

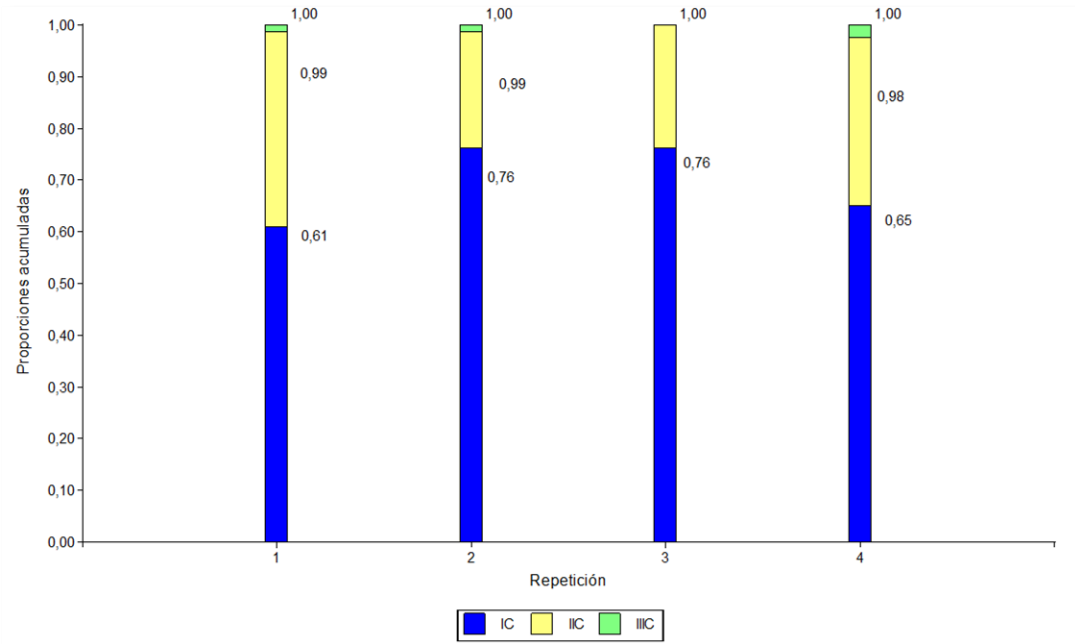


Fig. 2.2 Proporciones acumuladas de fascículos según el número de cariósides extraídos por fascículo (Ic: 1 cariósida; Iic: 2 cariósides; IIic: 3 cariósides) en *Cenchrus ciliaris* 'Texas' (n=100 fascículos en cada repetición).

La determinación del peso de 1000 fascículos fue de 2,640 gr. En base a este valor, se obtuvo el número aproximado de fascículos por kilogramo: 378.800 fascículos/Kg. Teniendo en cuenta el porcentaje de fascículos llenos (83 %) y la totalidad de fascículos por kilogramo, se estimó que 314.400 fascículos contuvieron al menos una cariósida en su interior y que un 17 %, o sea 64.400 fascículos, fueron vanos o vacíos. Asimismo, determinaciones realizadas por White *et al.* (1959), Bogdan (1966), Chakravarty *et al.* (1970) y Khalil *et al.* (2002) registraron valores de peso de 1000 fascículos entre 1,2 y 11,1 gr lo que indica la gran variabilidad en el peso que poseen las unidades de dispersión de *Cenchrus ciliaris*.

CONCLUSIONES

- La determinación del porcentaje de fascículos llenos es una técnica que permite cuantificar el porcentaje de cariósides formadas en unidades de dispersión de *Cenchrus ciliaris*.

- El número medio de carióspsides formadas por fascículo es un claro indicativo de la prolificidad del material, el cual se traduce en las posibilidades de germinar que tiene cada unidad de dispersión.
- El peso de 1000 semillas junto a la determinación de fascículos llenos permite expresar no sólo el número de fascículos por unidad de peso, sino además conocer el número de fascículos llenos que el lote de semillas posee.

BIBLIOGRAFÍA

Ateca N. 1997. Metodologías alternativas para determinar la calidad en semillas de *Panicum maximum* Jacq. cv. Gattom Panic. Tesis Magister. Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina, 97 pp.

Bogdan A.V. 1977. Seed morphology of some cultivated African grasses. Proceedings International Seed Testing Association, 31: 789-799.

Boonman J.G. 1993. East Africa's Grasses and Fodders: Their Ecology and Husbandry. Kluwer Academic Publisher. Dordrecht. The Netherlands, 339 pp.

Carambula M. 1984. Producción de semillas de plantas forrajeras. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur. Montevideo, Uruguay. 513 pp.

Chakravarty A.K., Ratan R. and Murari K. 1970. Variation in morphological and physiological characters in bunch-grass (*Cenchrus ciliaris* L.) and selection of high-yielding, nutritious types. Indian Journal of Agricultural Science, 40: 912-916.

Chin H.F. 1994 .Storage and testing of forage seeds in the tropics. Publicado en internet, disponible en www.fao.org/ag/Agp/AGPC/doc/publicat/GRASSLAN/151.pdf Activo junio 2017.

Clayton W.D. 1990. The spikelets. In: G.P. Chapman (ed.) Reproductive Versatility in the Grasses. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 32-51.

Crowder L.V. and Chheda H.R. 1982. Tropical Grassland Husbandry. Longman, London.

- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M. y Robledo C.W. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Everes G.W., Holt E.C. and Bashaw E.C. 1969. Seed production characteristics and photoperiodic responses in Buffel Grass, *Cenchrus ciliaris* L. *Crop science*, 9: 309-310.
- Ferguson J.E., Thomas D., R.P. de Andrade, Costa N.S. and Jutzi S. 1983. Seed production potentials of eight tropical pasture species in the region of Latin America. *Proceedings of XIV International Grassland Congress*, Lexington, Kentucky, USA. pp 275-278.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2006. Quality declared seed system. Publicado en internet, disponible en <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0503e/a0503e00.pdf> . Activo agosto 2014.
- Hacker J.B. and Ratcliff D. 1989. Seed dormancy and factors controlling dormancy breakdown in Buffel Grass accessions from contrasting provenances. *Journal of Applied Ecology*. 26: 201-212.
- Humphreys L.R. and Riveros F. 1986. *Tropical Pasture Seed Production*. 3er edn. FAO Plant Production and Protection, Paper 8. Rome.
- ISTA. 2009. International Seed Testing Association. *Handbook on Seedling Evaluation*. Third Edition. (Ed.) R. Don. Zürich
- ISTA. 2012. International Seed Testing Association. *International Rules for Seed Testing*. Seed science and Technology 31, Supplement. Zürich
- Khalil M., Marjolein V., Mohamed N., Dirk R. and Chaïb M. 2002. Seed and spike traits from remnant populations of *Cenchrus ciliaris* L. in South Tunisia: high distinctiveness, no ecotypes. *Journal of Arid Environments*. 50: 309-324.
- Nefatti M. 1994. *Caracterization morpho-biologique de certaines especes végétales nord-africaines. Implications pour l'amélioration pastorale*. University of Ghent, dissertation, 264 pp.
- Pandeya S.C. and Jayan P.K. 1978. Rang management –seed and germinability of eleven ecotypes of *Cenchrus ciliaris* under different agronomic condition. *Proceeding of Indian National Science Academy* 44: 266-281.

- Parihar S.S. and Pathak P.S. 2006. Flowering phenology and seed biology of selected tropical perennial grasses. *Tropical Ecology* 47(1) 81-87.
- Parihar S.S., Kanodia K.C. and Rai P. 1984a. Effect of storage and removal of glumes on germination of *Cenchrus ciliaris*. *Indian Journal of Ecology*. 11: 313-316.
- Parihar S.S., Kanodia K.C. and Rai P. 1984b. Seed germination studies with *Cenchrus setigerus* I. Effect of age (storage) and removal of glumes on germination. *Indian Journal of Range Management*. 5: 5-9.
- Silcock R.G. and Smith F.T. 1990. Viable seed retention under field conditions by western Queensland pasture species. *Tropical Grassland*. Volume 24, 65-74.
- Song L., Veness G. and Kalms. 2007. Field germination of tropical grasses with new seed coating technology. Proceedings of the 23rd Annual Conference of the Grassland Society of NSW. Publicado en internet, disponible en <http://grasslandnsw.com.au/news/wp-content/uploads/2009/07/Song-Veness-Kalms-2008.pdf>. Activo agosto 2014.
- Yadav M.S., Mehra K.L. and Magoon M.L. 1974. Genetic variability and correlations of a few quantitative characters in the pasture grass, *Cenchrus ciliaris*. *Indian Forester*, 100: 512-517.
- Whyte R.O., Moir T.R. and Cooper J.P. 1959. *Grasses in agriculture*. Rome: FAO Agricultural Studies. N°42, FAO. 485 pp.

CAPÍTULO III. VIABILIDAD POR TETRAZOLIO

INTRODUCCIÓN

Los períodos de tiempo relativamente largos requeridos para llevar a cabo las pruebas de germinación pueden afectar el proceso hacia una mayor eficiencia en la obtención de semillas para siembra y las operaciones de venta. Esto deriva a que las decisiones respecto al procesamiento, almacenamiento, mezcla y destino de lotes de semillas se basen en la intuición, en la experiencia o bien deban posponerse por días o semanas hasta que se tengan resultados de la prueba de germinación. Por otra parte, otros factores de la calidad de semillas tales como la pureza, la detección de semillas de malezas y el contenido de humedad, pueden ser evaluados en pocos minutos. Sin embargo, determinar solo dichas características no es suficiente ya que la semilla es de utilidad solamente si un porcentaje relativamente alto de ella es viable. Por tal razón, la prueba de tetrazolio, para determinar la viabilidad, adquiere relevancia ya que permite obtener resultados en horas, en vez de días o semanas (Delouche *et al.*, 1962).

La prueba de tetrazolio (TZ) cuyo objetivo es determinar el número de semillas viables y no viables que posee una muestra (Ellis *et al.*, 1985), se basa en la actividad de las enzimas deshidrogenasas (AOSA, 1983; Bulat, 1961; Copeland *et al.*, 1959; Moore, 1973; Smith, 1952; Smith y Throneberry, 1951; Franca Neto, 1999) las cuales catalizan las reacciones respiratorias de las mitocondrias durante la glicólisis en el ciclo de Krebs. Cuando la solución de tetrazolio es difundida a través de los tejidos seminales, ocurre en las células vivas la reducción de la sal de tetrazolio (cloruro o bromuro de 2-3-5 trifenil de tetrazolio) y la formación de un compuesto denominado trifenil-formazán, caracterizado por ser estable, no difusible y de color rojo-rosado (Glenner, 1990). Puesto que la reacción ocurre dentro de las células y el pigmento es no difusivo, existe una delineación perfectamente nítida entre el tejido que respira (viable) y el que no respira (no viable). El primero adquiere el color característico rojo mientras que el segundo mantiene su color natural (Delouche *et al.*, 1962).

Los lineamientos para el ensayo de viabilidad expresados en las Reglas Internacionales de Análisis de Semillas (ISTA, 2012) y en las Hojas de Trabajo de la Prueba de Tetrazolio de ISTA (2003) para especies de cultivos agrícolas y hortícolas, incluyen los distintos tipos de pretratamiento que se pueden realizar en semillas secas (acondicionamiento), la preparación para la tinción, la concentración de solución de tetrazolio, el tiempo y temperatura que las muestras pasarán incubándose. La concentración de la solución de tetrazolio que ISTA recomienda para la mayoría de las especies agrícolas es del 1 %, aunque concentraciones mayores o menores pueden ser utilizadas. Los tiempos de tinción dependen de la temperatura a la cual se realice la incubación, un gran número de especies se tiñen adecuadamente entre 2 a 18 horas a una temperatura de 30 °C. Las reglas indican que rangos de temperatura entre 20 a 40 °C también pueden ser utilizadas, teniendo en consideración que incrementos o reducciones de 5 °C del óptimo de 30 °C, disminuyen o aumentan a la mitad el tiempo de tinción.

Un problema que tiene la determinación de viabilidad por tetrazolio en *Buffel Grass* es la obtención de material adecuado para la realización de los ensayos, ya que las cariósides están dentro de las estructuras de protección, y éstas, a su vez deben ser representativas de la muestra que se está por analizar. La evaluación de la fracción de semilla pura de *Cenchrus ciliaris* descrita en las reglas ISTA no es complicada de ejecutar, pero para que la valoración de la calidad sea más precisa es necesario además determinar el porcentaje de fascículos llenos (Capítulo II). De esta forma se obtienen cariósides, material indispensable para realizar los ensayos de viabilidad. En especies como *Chloris gayana* y *Panicum* las reglas ISTA (2012) establecen que en aquellas espiguillas que no contienen cariósides, se deben considerar no viables. Particularmente en *Cenchrus*, género no incluido en el capítulo de viabilidad de ISTA (2012) pero sí en las Hojas de Trabajo de la prueba de Tetrazolio (ISTA, 2003), no hay una sugerencia de cómo considerar los fascículos vacíos cuando se realiza viabilidad por tetrazolio.

La viabilidad es determinante para conocer el potencial máximo de germinación que posee un lote de semillas, más aún cuando los ensayos son influenciados por latencia o dormición. La prueba de viabilidad es usada primariamente como una forma rápida de estimación de la viabilidad de las semillas y es una importante medida para

distinguir entre semillas muertas y semillas con dormición (Gosling, 2003). De esta manera, ISTA (2012) señala que cuando el porcentaje de semillas frescas encontradas al finalizar un análisis de germinación supera el 5 %, un método para determinar si las semillas están o no vivas es la prueba de viabilidad con tetrazolio. Aquellas semillas que tengan potencial de germinar serán reportadas como semillas frescas, mientras las que no como muertas. Por lo expresado, la prueba de viabilidad se presenta como una técnica complementaria de análisis en los ensayos de germinación.

Moore (1987) indicó que para realizar una correcta evaluación de la muestra analizada es importante observar detalladamente el patrón de tinción del embrión, la intensidad de la coloración y la turgencia de los tejidos. La observación de tales diferencias con el conocimiento de las diversas estructuras de las semillas, permite la identificación, localización y naturaleza de los disturbios que pueden ocurrir en los tejidos embrionarios (Moore, 1973).

Cuando se realiza un ensayo de viabilidad, la mayoría de las semillas requieren previo a la tinción, ser humedecidas. Este humedecimiento inicia la actividad metabólica celular, facilita los cortes de los tejidos seminales, mejora la tinción y la interpretación de los resultados. En las reglas ISTA (2012) existe, la recomendación de corte en semillas de Poáceas forrajeras como: *Brachiaria* spp., *Chloris gayana*, *Dactylis* spp., y *Panicum* spp. a pesar de su escaso tamaño. El método de corte recomendado por las Hojas de Trabajo de la Prueba de Tetrazolio (2003) para *Cenchrus* es el corte longitudinal a través de la mitad distal del endospermo. Otros tipos de cortes como el longitudinal incompleto a través del embrión y $\frac{3}{4}$ del endospermo y el transversal completo son sugeridos para especies de pastos.

Debido a la complejidad que posee la evaluación de la calidad de semillas en *Cenchrus ciliaris* el Instituto Nacional de Semillas (INASE) establece para la comercialización, además de un valor mínimo de poder germinativo, valores de referencia mínimos de viabilidad. El poder germinativo es 20 %, mientras que la viabilidad por tetrazolio es del 35 % (Subtropicales Resolución 3502011 Reemplaza (Deroga) la disposición 1/1989) (Anexo N° I). Tanto el ensayo de poder germinativo (PG) como el de viabilidad suelen presentar inconvenientes. El PG en pocas ocasiones alcanza valores de germinación que lleguen al mínimo requerido, aun cuando los tiempos para el análisis son largos (28 días); mientras que la metodología para la

determinación de la viabilidad por tetrazolio se encuentra descrita de forma general en las Hojas de Trabajo de la Prueba de Tetrazolio ISTA (2003).

Según las Hojas de Trabajo de la Prueba de Tetrazolio (ISTA, 2003) un desafío de la prueba de tetrazolio es la investigación para ajustar la metodología de géneros incluidos en estas reglas, pero que aún no están validadas e integradas en las reglas ISTA (2012). Siendo que el protocolo de *Panicum* presente en ISTA (2012) guarda similitudes con los protocolos establecidos por las Hojas de Trabajo para el ensayo de Tetrazolio (2003) para *Cenchrus*, se plantea el siguiente objetivo:

OBJETIVO

Establecer especificaciones para realizar la prueba de viabilidad por tetrazolio utilizando los protocolos de *Panicum* (ISTA, 2012) aplicados a *Cenchrus ciliaris*.

Evaluar la tinción de las cariósides en relación a:

- a- Preparación del material (tipos de cortes de cariósides).
- b- Concentración de la solución de tetrazolio.
- c- Tiempos de tinción.
- d- Elaboración de patrones de tinción.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico para la realización de los ensayos

El material estudiado es el mismo que el utilizado en el Capítulo II. Fascículos de *Cenchrus ciliaris* ‘Texas’ ingresados al laboratorio de Análisis de Semillas, Investigación, Docencia y Servicios (LASIDYS) de la FCA-UNC, durante el mes de julio del 2013, para su respectivo análisis de rutina. Se almacenó en bolsas de papel a una temperatura de 25 °C hasta el posterior uso en los ensayos.

Se utilizaron las cariósides extraídas de los fascículos según la metodología descrita en el Capítulo II. El acondicionamiento de las cariósides previo a la tinción con tetrazolio se efectuó siguiendo las pautas generales fijadas por ISTA (2012) para *Panicum* spp. Cada una de las repeticiones se colocó entre papel de germinación humedecido con agua destilada durante un período de 18 horas y dentro de cajas de Petri para evitar la deshidratación del material. La temperatura de humedecimiento fue de 20 °C. La observación de cariósides en los distintos ensayos se realizó con lupa Motic SMZ-168 Serie trilocular (50x) equipada con conjunto para videomicroscopía digital 1.3 MP MotiCAM.

Evaluación de tipos de corte

Una vez humedecidas las cariósides, se realizaron los tratamientos de corte y en cada uno se trabajó con nivel constante de temperatura y concentración de tetrazolio. De acuerdo a lo prescripto por ISTA (2012) para *Panicum* spp. la temperatura de tinción fue de 30 °C; la concentración de la sal de tetrazolio del 1 % y el tiempo de tinción 18 horas. Cada tratamiento estuvo formado por cuatro repeticiones de 25 cariósides, tomados al azar.

Los tratamientos realizados en las cariósides de *Cenchrus ciliaris* fueron los siguientes (Figura 3.1):

- a- Testigo: compuesto por cariósides intactas sin cortar.
- b- Corte longitudinal incompleto: corte con bisturí por la región media del embrión y aproximadamente hasta $\frac{3}{4}$ del endospermo.
- c- Corte longitudinal completo: corte total con bisturí por la región media del embrión y endospermo. Luego del corte se eliminó una de las mitades.
- d- Corte transversal: corte con bisturí encima de la región donde se ubica el embrión descartando el resto de la cariósida.

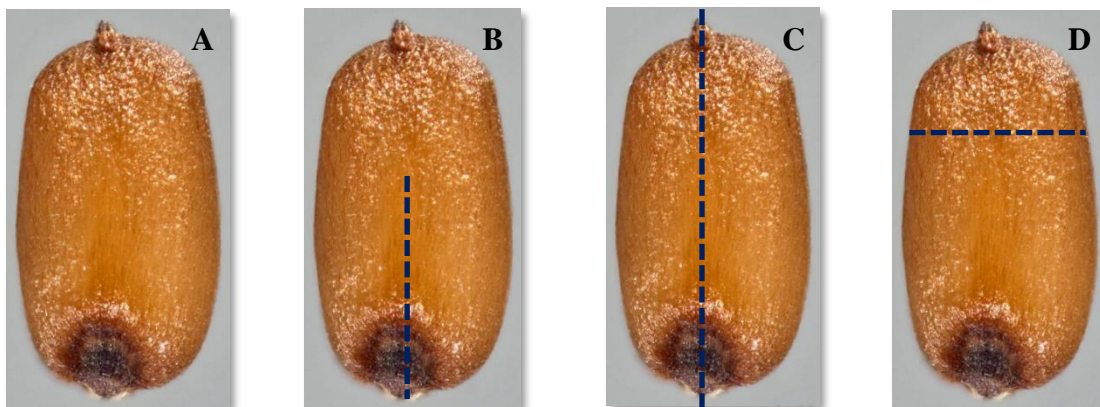


Fig. 3.1 Tratamientos de cortes realizados en las cariósides de *Cenchrus ciliaris* 'Texas'. La zona de corte se muestra con línea punteada. **A)** Testigo (sin cortar); **B)** Corte longitudinal incompleto; **C)** Corte longitudinal completo; **D)** Corte transversal completo.

Determinación del tiempo óptimo de tinción y concentración de tetrazolio

Según protocolos (ISTA, 2012) la tinción se llevó a cabo en estufa con temperatura de 30 °C en completa oscuridad. Conforme a los resultados obtenidos en el punto anterior, se utilizó el método de corte de mejor desempeño.

Las concentraciones de tetrazolio utilizadas fueron de 0,5 % y 1 %. El progreso de la tinción se evaluó cada 2 horas retirando de la solución de tetrazolio aquellas cariósides con sus estructuras esenciales teñidas y consideradas viables. Los ensayos se extendieron hasta que se interpretó que los mismos debían concluir a causa de la no tinción de nuevas cariósides en evaluaciones sucesivas. Los valores obtenidos en cada una de las repeticiones fueron comparados con las tablas de tolerancia de las reglas ISTA (2012).

Determinación de los patrones de tinción

El desarrollo de los patrones de tinción fue realizado mediante la técnica de corte, concentración de tetrazolio y tiempos de tinción que resultaron de los ensayos precedentes. La fotografía de las cariósides se efectuó con un equipo de microscopía

óptica Confocal Olympus LEXS OLS 4000. Las cariósides se evaluaron y fueron clasificadas como viables y no viables discriminando cada caso según la tinción lograda en los tejidos esenciales. Fueron utilizados como referencia protocolos de viabilidad de semillas de Poáceas pequeñas obtenidos en trabajos realizados en la Estación Experimental INTA Oliveros, de protocolos ISTA (2012) para Poáceas (*Avena*, *Hordeum*, *Secale* y *Triticum*) y de las Hojas de Trabajo de Tetrazolio (ISTA, 2003) para *Cenchrus*.

Diseño experimental y análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2015) desarrollado por la cátedra de Estadística y Biometría de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba. Para detectar diferencias entre tratamientos se utilizó la técnica ANAVA considerando un modelo para un diseño completamente aleatorizado.

El modelo propuesto para comparar los efectos de los tipos de corte realizados en cariósides, fue:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

donde:

Y_{ij} ésima observación del i -ésimo tratamiento.

μ media general de las observaciones.

τ_i efecto del tratamiento i -ésimo.

ε_{ij} término de error aleatorio asociado a la observación Y_{ij} con $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$.

En el ensayo de viabilidad, para evaluar los efectos de los factores concentración de tetrazolio y tiempo de tinción, se ajustó el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \delta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} representa la respuesta de la k -ésima repetición en el i -ésimo nivel del factor tiempo de tinción y j -ésimo nivel del factor concentración de tetrazolio.

μ representa una media general, de las observaciones.

α_i el efecto que produce el i -ésimo nivel del factor tiempo de tinción.

β_j corresponde al efecto del j -ésimo nivel del factor concentración de tetrazolio.

δ_{ij} el efecto interacción para la combinación de los niveles i del factor tiempo de tinción y j del factor concentración de tetrazolio.

ε_{ijk} es el error aleatorio asociado a la observación ijk -ésima con $\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$

En todos los análisis las comparaciones entre las medias de tratamientos se realizaron con la prueba LSD de Fisher. El nivel de significación se estableció en 5 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tipo de corte en cariósides

El análisis de la varianza (ANAVA) realizado sobre los tratamientos para evaluar los tipos de corte demostró la presencia de diferencias significativas. Así, la comparación de medias por el test de Fisher manifestó que no hubo diferencias entre los porcentajes de semillas viables de los tratamientos con corte y que la viabilidad promedio del testigo fue menor ($p < 0,05$) (Figura 3.2).

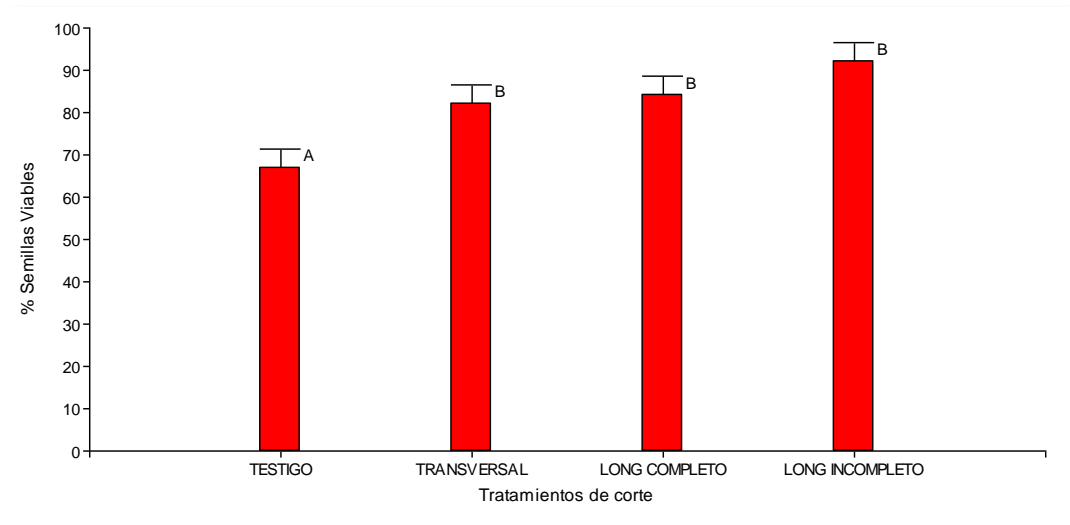


Fig. 3.2 Porcentaje de semillas viables de *Cenchrus ciliaris* 'Texas' comparando distintos tratamientos de cortes de cariósides. Letras iguales indica la no existencia de diferencias significativas entre los tratamientos (*Fisher* $p < 0,05$).

Asimismo, las cariósides intactas presentaron un alto porcentaje (33 %) sin teñir. La Figura 3.3 muestra los valores medios obtenidos durante los ensayos de viabilidad por tetrazolio. Se observa que con el corte longitudinal incompleto se obtuvo el mínimo valor de cariósides no viables (8 %).

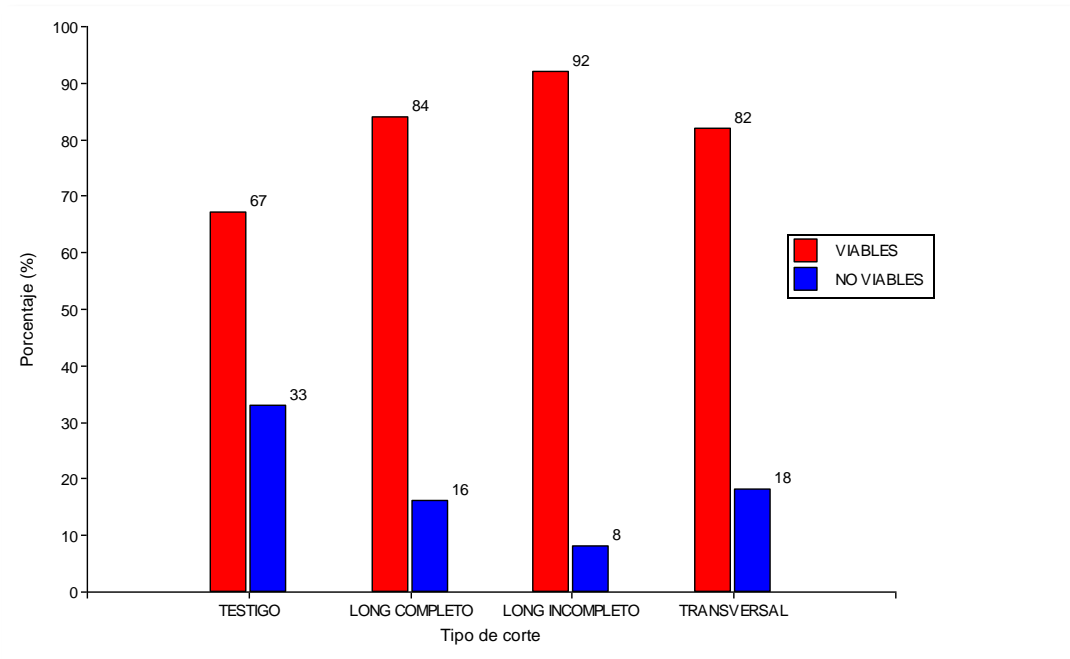


Fig. 3.3 Porcentaje de semillas viables y no viables de *Cenchrus ciliaris* 'Texas' en distintos tratamientos de cortes de cariósides.

Según estos resultados, se decidió que los tratamientos de corte fueron más apropiados por sobre el testigo, el cuál necesitó de tiempos mayores de exposición a la solución de tetrazolio para lograr teñir de forma similar a los cortados. La falta de tinción del testigo no fue exclusivamente consecuencia de la mortalidad de tejidos, sino de la escasa difusión de la solución al interior de las cariósides. Por lo tanto, utilizar cariósides sin cortar implicaría un mayor tiempo de incubación en estufa y la necesidad de realizar cortes adicionales para una mejor evaluación. De acuerdo a lo expresado por Moore (1987) para evaluar correctamente, es necesario visualizar el aspecto interno de los tejidos, tales características difícilmente sean observadas en semillas intactas o sin cortes previos en la región embrional.

Debido a que no fueron halladas diferencias significativas entre los tratamientos de corte, el tipo de corte a recomendar depende de la factibilidad técnica. Justamente, se puede mencionar que el corte transversal tiene como desventaja el de requerir cortes adicionales para poder visualizar las estructuras internas del embrión, semejante a los cariósides sin cortar. Con el corte longitudinal completo la dificultad se debe a que se descarta una de las mitades del cariósido con lo cual hay posibilidad de subestimar o sobrestimar la viabilidad real del material. De esta forma, el corte longitudinal incompleto (tratamiento b) es el más adecuado para determinar la viabilidad por tetrazolio en cariósides de *Cenchrus ciliaris*, por ser el más fácil de ejecutar al no requerir cortes adicionales y favorecer una adecuada tinción de las estructuras del embrión. La posición centrada del embrión no es un impedimento para la realización de los cortes, más bien los beneficia, aunque el reducido tamaño hizo necesario el uso de lupa binocular y de elementos de corte con adecuado filo.

Tanto en las reglas ISTA (2012) para *Panicum* como en las Hojas de Trabajo de Tetrazolio (2003) para *Cenchrus* los cortes sugeridos previos a la tinción no son a través de la zona embrionaria por lo cual, recomiendan la apertura de las semillas luego de la tinción. En los ensayos realizados los tipos de cortes que requirieron cortes posteriores (testigo y transversal completo) fueron los más complicados de realizar a causa de flacidez de los tejidos, probablemente dado por tiempos de humedecimiento excesivos.

Determinación del tiempo de tinción y concentración de tetrazolio

Para estas determinaciones se practicaron en las cariósides, en consecuencia a los resultados obtenidos en el ensayo anterior, cortes longitudinales incompletos. El ANAVA reveló diferencias significativas durante el transcurso de la prueba de viabilidad. Se observó interacción significativa entre los factores tiempo y concentración de TZ ($p=0,0334$).

La Figura 3.4 muestra los porcentajes de viabilidad obtenidos para las diferentes concentraciones de TZ (0,5 y 1 %) y en cada tiempo de evaluación (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16 horas a partir del inicio del ensayo).

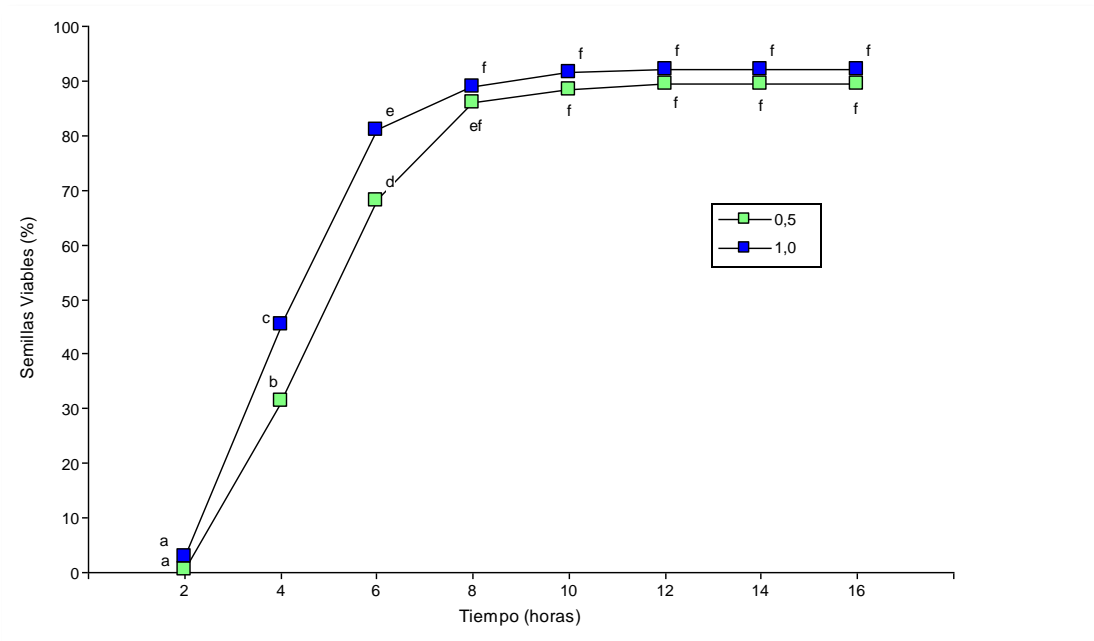


Fig. 3.4 Porcentaje de viabilidad de semillas de *Cenchrus ciliaris* 'Texas' sometidas a diferentes concentraciones de tetrazolio y tiempos de tinción. Letras iguales indican que no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Fisher $p<0,05$).

Para las dos concentraciones de TZ utilizadas, el porcentaje de semillas viables fue en aumento hasta las diez horas, y a partir de dicho momento no hubo un incremento significativo en el número de semillas teñidas.

En la evaluación de las 2 horas de iniciado el ensayo, no se encontraron diferencias significativas entre las medias, siendo el porcentaje de semillas teñidas bajo para las dos concentraciones de tetrazolio. Durante el período comprendido entre las 4 y 8 horas se registraron diferencias significativas, siendo la solución de tetrazolio al 1 % la que produjo mayor porcentaje de tinción. Para todas las lecturas realizadas posteriores a las 8 horas desde el inicio del ensayo, las diferencias observadas para las dos concentraciones estudiadas no resultaron significativas.

Los resultados indican que en *Cenchrus ciliaris* un test de viabilidad puede realizarse en poco más de 24 horas: 18 horas pre-humedecimiento y 10 horas de tinción. El tiempo de evaluación dependerá del entrenamiento del analista. Estos datos no son de soslayar en la especie estudiada la cual tiene un prolongado tiempo de ejecución del análisis de germinación y dormición que puede enmascarar expresión de la germinación. Conclusiones similares respecto a la rapidez de ensayos de TZ fueron expresadas por Delouche *et al.* (1962) para semillas de Poáceas, entre ellas *Cynodon dactylon* (L.) Pers. y *Festuca arundinacea* Schreb.

La importancia de la viabilidad por tetrazolio en semillas que muestran dormición es indicada en ISTA y por Gosling (2003). Conforme a ello, en *Cenchrus ciliaris* se observó que la determinación de semillas viables y no viables es (hasta superada dicha condición) la única forma de evaluar la calidad fisiológica de forma certera. Observando las curvas de viabilidad relacionadas con la concentración de tetrazolio y tiempo de tinción (Figura 3.4) se recomienda tanto la concentración de tetrazolio al 0,5 % como al 1 % con 10 horas de incubación. Estos tiempos son menores a los recomendados por las Hojas de Trabajo de Tetrazolio de ISTA (2003) para *Cenchrus* que prescriben 18 horas de tinción, aunque con cortes longitudinales a través de la mitad distal del endospermo de las cariósides, lo que puede retardar la difusión del tetrazolio hacia el embrión.

Patrones de tinción

Los patrones de tinción o mapas topográficos clasifican las semillas en viables y no viables a través de la coloración de los tejidos del embrión. En la muestra

estudiada, las semillas viables sin defectos y las no viables (sin teñir) fueron las más frecuentes. Sin embargo, para facilitar la evaluación de distintos materiales y a causa de la diversidad de daños posibles de ser encontrados dentro de un lote de semillas, se describieron sub-clases dentro de cada clase, las cuales fueron agrupadas dentro de: semillas viables, viables con defectos y no viables. Las distintas estructuras de importancia para la evaluación de cariósides de *Cenchrus ciliaris* se encuentran identificadas en una cariósida viable sin defectos (Figura 3.5).

Los patrones de coloración observados guardan similitud con los expuestos en ISTA (2003), aunque éstos últimos no expresan la totalidad de daños posibles de ser encontrados en cariósides de *Cenchrus*, probablemente por el exiguo tamaño de las semillas. Los daños observados en *Cenchrus ciliaris* fueron semejantes a los plasmados en los protocolos ISTA (2012) para cariósides de mayor tamaño como de *Avena*, *Hordeum*, *Secale* y *Triticum*. La minuciosidad de la evaluación dependerá, por lo tanto, del uso de lupa binocular con adecuada iluminación.

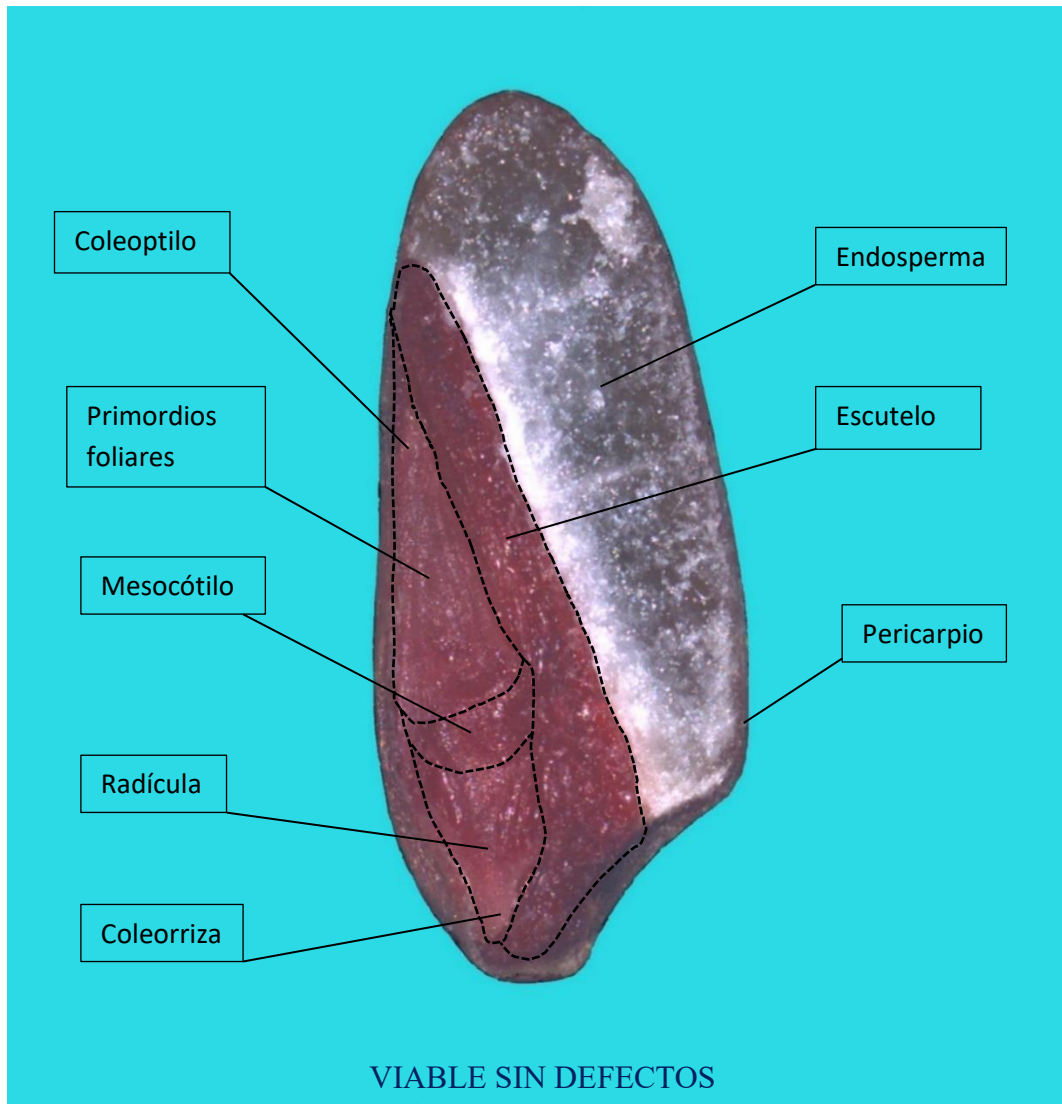


Fig. 3.5 Cariópside viable de *Cenchrus ciliaris* completamente teñido con tetrazolio. Con línea punteada se resaltan áreas esenciales para la evaluación de viabilidad.

La figura 3.6 y 3.7 muestra los patrones de tinción realizados con tetrazolio en *Cenchrus ciliaris*. La figura 3.8 muestra una cariópside no viable sin tinción.

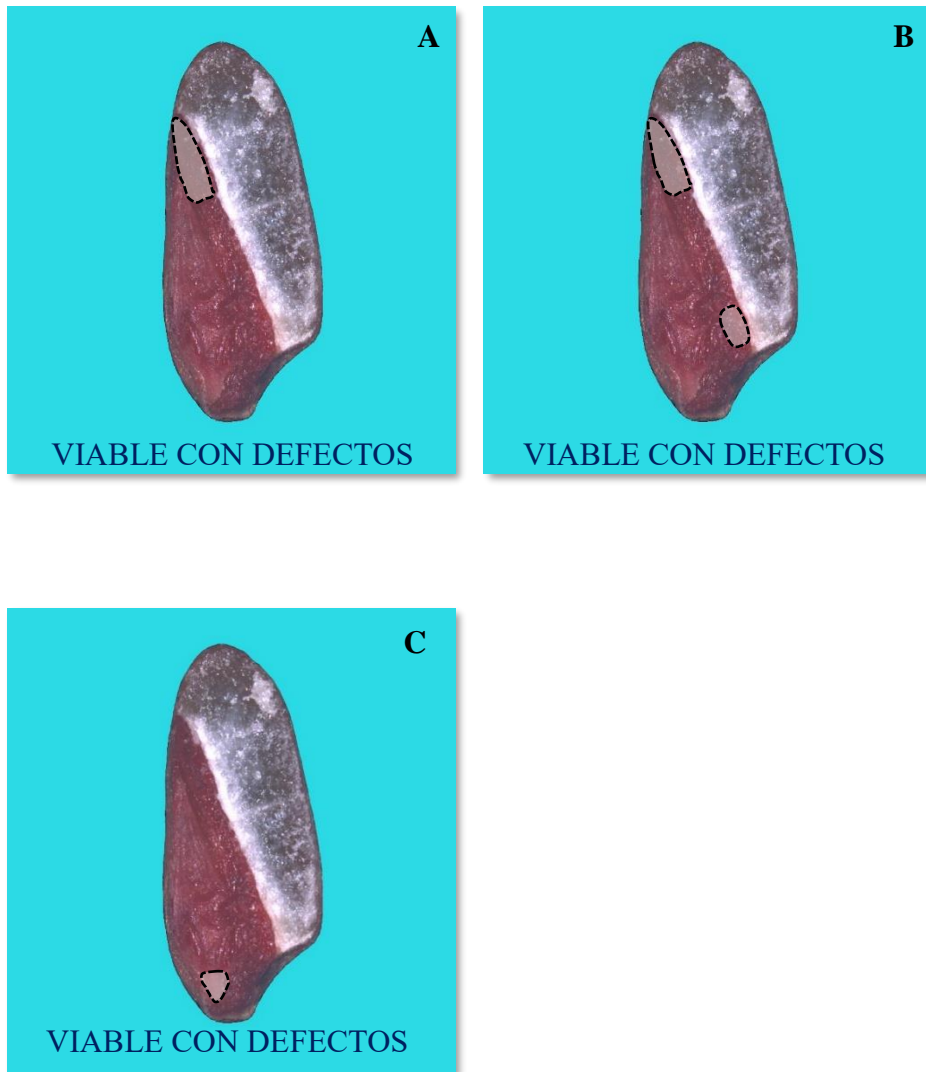


Fig. 3.6 Cariópsides viables con defectos de *Cenchrus ciliaris* luego de la tinción con tetrazolio. **A)** Escutelo con extremo superior menor o igual a $1/3$ sin teñir o necrosado. **B)** Escutelo con extremos superior e inferior menor o igual a $1/3$ sin teñir o necrosado. **C)** Coleorriza sin teñir o necrosada.

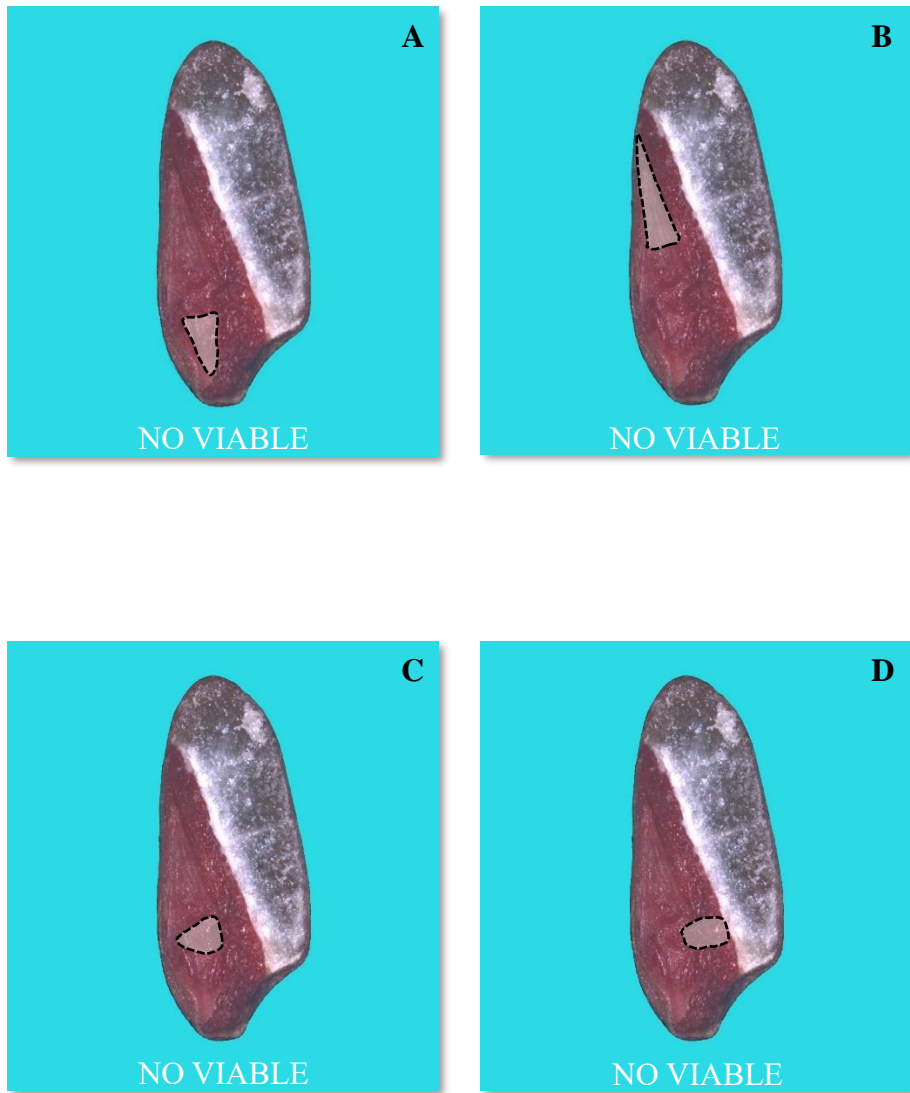


Fig. 3.7 Cariópsides no viables de *Cenchrus ciliaris* luego de la tinción con tetrazolio. **A)** Coleorriza y radícula sin teñir o necrosada. **B)** Extremo coleoptilo sin teñir o necrosado. **C)** Mesocótilo sin teñir o necrosado. **D)** Escutelo banda unión con mesocótilo sin teñir o necrosado.



Fig. 3.8 Cariópside no viable de *Cenchrus ciliaris* luego de la tinción con tetrazolio

Integración de resultados

En aquellos materiales compuestos exclusivamente por fascículos, la viabilidad se expresará teniendo en cuenta el porcentaje de fascículos llenos que la muestra tuvo cuando se determinó la calidad física. La siguiente fórmula permite ajustar la viabilidad de las cariósides al porcentaje de fascículos llenos:

$$\% \text{ viabilidad ajustada: } \frac{\% \text{ cariósides viables} * \% \text{ fascículos llenos}}{100}$$

Por lo tanto, la expresión los resultados complementando los análisis de calidad física (Capítulo II) con los de viabilidad por tetrazolio es el siguiente:

Porcentaje de fascículos llenos (% LI): 83 %

Viabilidad de cariósides: 92 %

Viabilidad ajustada: 76 %

Peso de 1.000 fascículos: 2,640 gr

Cantidad de fascículos por Kg: 378.800

Cantidad de fascículos viables por Kg.: 287.800 (Viabilidad ajustada: 76 %)

CONCLUSIONES

- Los protocolos de *Panicum* (ISTA, 2012) no son aplicables para *Cenchrus* por dos motivos: en *Cenchrus* los tiempos apropiados de tinción son de 10 horas y el método de corte más adecuado fue el longitudinal incompleto a través del embrión y hasta 3/4 del endospermo.
- Practicar en cariósides de *Cenchrus ciliaris* cortes longitudinales incompletos permite determinar más certeramente la viabilidad, ya que favorece la tinción de los tejidos y la visualización de las estructuras a evaluar.
- El humedecimiento entre papel 18 horas a 20 °C, las concentraciones de tetrazolio de 0,5 % y 1 %, y 10 horas de incubación a 30 °C son las condiciones más adecuadas para la preparación y tinción de cariósides de *Cenchrus ciliaris*.
- Los patrones de tinción realizados permiten diferenciar de forma exacta la viabilidad de cariósides de *Cenchrus ciliaris* de manera semejante a otras semillas de Poáceas.

BIBLIOGRAFÍA

- AOSA 1983. The seed Vigor Test Committee. Seed Vigor testing handbook. [S.1.]. the Handbook on Seed Testing, contribution.32. 88pp.
- Bulat H. 1961. Reduction processes in living tissue, formazan, tetrazolium salts and their importance as reduction-oxidation indicators in resting seed. Proceeding of the international Seed Testing Association, Copenhagen, v.26, pp 686-696.
- Copeland T.G., Bruce C.F., Midyette Jr. J.W. 1959. The unofficial application of tetrazolium test as an aid in checking germination claims. Proceedings of the Association of Seed Analyst, East Lansing, v.49. pp 134-141.
- Delouche J.C., Wayne Still T., Raspet M. and Lienhard M. 1962. Prueba de viabilidad de la semilla con tetrazol. Estado de Mississippi. EEUU., 71 pp.

- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez, Tablada M. y Robledo C.W. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Ellis R.H., Hong T.D. and Roberts E.H. 1985. Handbook of seed technology for gene banks, vol. 2, Compendium of specific germination information and test recommendations. International Board for Plant Genetic Resources IBPGR, Rome. 667 pp.
- Franca Neto J.C. 1999. Test de tetrazolio para determinación de vigor de semillas. En: Vigor de Sementes: Conceitos e Testes. Krzyzanowski, F.C., Vieira R. D., Franca Neto J. B. Londrina, PR, Brasil. pp 8-1, 8-5.
- Glenner G.G. 1990. Formazans and Tetrazolium Salts. En: Biological Stains. Lillie R.D.; M.D. Sigma Chemical Company. pp. 225-235.
- Gosling P.G. 2003. Viability testing. In: Smith R.D., Dickie J.B., Lenington S.H., Pritchard H.W., Probert R.J. Editors. Seed Conservation: Tuning Science into Practice. Royal Botanic Gardens, Kew, U.K. pp. 445-481.
- ISTA. 2003. International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing. Working Sheets on Tetrazolium Testing. Volume 1. Zürich
- ISTA. 2012. International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing. Seed science and Technology 31, Supplement. Zürich
- Moore R.P. 1973. Tetrazolium staining for assessing seed quality. In: Seed Ecology Heydecker, W. ed. London. Butterworth. pp. 347-366.
- Moore R.P. 1987. Manual de ensayos al tetrazolio. Traducción original del Comité de Tetrazolio de la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas ISTA, por el Instituto Nacional de Semillas y Plantas de Vivero, Estación de Ensayos de Semillas, España. pp.70.
- Smith F.G. 1952. The mechanism of the tetrazolium reaction in corn embryos. Plant Physiology, Bethesda, v.27.pp.445-456.
- Smith F.G. and Throneberry G.O. 1951. The tetrazolium test and seed viability. Proceedings of the Association Official Seed Analysts, East Lansing, v.40. pp. 105-109.

CAPÍTULO IV. GERMINACIÓN

INTRODUCCIÓN

La germinación es un proceso que se presenta en las semillas cuando tienen condiciones adecuadas para desarrollar una plántula normal, aunque en muchas especies este fenómeno no sucede debido a que presentan un estado de dormición. La presencia de dormición es frecuente en especies utilizadas como pasturas; específicamente *Cenchrus ciliaris*, ha sido citada en numerosos trabajos que buscan explicar las bases morfológicas y fisiológicas de esta condición propia de diversas semillas.

En los sistemas ganaderos, es usual la alimentación de animales basada en pasturas naturales junto al cultivo de especies forrajeras introducidas. La dormición de semillas en las especies utilizadas con fin de pastoreo puede ser el mayor problema cuando se desea realizar la implantación de las pasturas. Mientras que, por otra parte, la dormición combinada a una gran producción de semillas, es la principal causa de la persistencia de malezas Poáceas compitiendo de manera efectiva con los principales cultivos en todo el mundo. Esta condición es de vital importancia para la sobrevivencia de los pastos en ambientes naturales de los cuales proceden (Simpson, 1990).

Que una semilla viable germine y el tiempo en el cuál lo hace, depende de numerosos factores, algunos propios de las semillas y otros presentes en el ambiente que las rodea. Es así, que la semilla debe estar rodeada de un ambiente físico-químico propicio. El agua y el oxígeno deben estar disponibles y las sustancias químicas inhibitorias de la germinación deben estar ausentes. El ambiente físico también debe ser favorable. La temperatura tiene que ser adecuada y, en muchos casos, se necesita luz en cantidad y calidad. Sin embargo, en diversas ocasiones dichas condiciones pueden ser satisfechas y la germinación no ocurre (Bewley y Black, 1994).

Baskin y Baskin (2004) caracterizaron una semilla (u otra unidad de germinación) durmiente como aquella que aun siendo viable no germina, o retrasa la

germinación, bajo la combinación de factores físicos ambientales considerados favorables durante un período específico de tiempo. A diferencia, una semilla no durmiente es aquella que tiene la capacidad de germinar bajo un amplio rango de factores físicos ambientales. Los principales factores del medio que ejercen efectos sobre la germinación son luz-oscuridad, temperatura y humedad.

De acuerdo al esquema de Nikolaeva (1977) fueron actualizadas y descritas por Baskin y Baskin (2004) cinco tipos de dormición que pueden exhibir las semillas: morfológica, fisiológica, morfofisiológica, física y combinada (física y fisiológica). Los distintos tipos responden a características inherentes a las semillas como: la permeabilidad o impermeabilidad de las cubiertas seminales; el estado de desarrollo en que se encuentra el embrión y el estado fisiológico embrional (Baskin y Baskin, 1989).

Para el caso de semillas con **dormición fisiológica** caracterizaron 3 niveles: profunda, intermedia y poco profunda. Cada uno responde a distintos tratamientos necesarios para que las semillas logren germinar: escisión del embrión, utilización de ácido giberélico, estratificación, almacenamiento en seco y escarificado. La mayoría de las especies con dormición fisiológica tienen una dormición poco profunda (Baskin y Baskin, 2004).

En el caso de las semillas con **dormición morfológica** el embrión es pequeño, poco desarrollado y diferenciado. El retraso de la germinación se debe a que estas semillas requieren de un tiempo prolongado para el crecimiento embrional y la emergencia radicular, luego que la semilla ha sido dispersada. Los embriones en estas semillas no están fisiológicamente dormidos, por lo que no requieren pretratamientos para la ruptura de dormición, solo necesitan mayor tiempo para desarrollar un tamaño pleno y germinar. El período de dormición está dado por el tiempo comprendido entre la incubación de semillas frescas y la protrusión radicular (Baskin y Baskin, 2004).

Los casos de **dormición morfofisiológica** ocurren en aquellas semillas que poseen un embrión poco desarrollado, además de un componente de dormición fisiológico. En este tipo, las semillas para germinar requieren de algún pretratamiento para la ruptura de dormición. Generalmente, en estas el tiempo entre el crecimiento

del embrión y la emergencia radicular es mayor que en aquellas que poseen dormición morfológica (Baskin y Baskin, 2004).

La **dormición física** es causada por una o más capas de células impermeables al agua, en las cubiertas seminales o en la pared de los frutos. La ruptura de la dormición ocurre aquí mediante la apertura de un orificio natural o artificial (excepto escarificación mecánica) por el cual el agua pueda ingresar hasta el embrión (Baskin *et al.*, 2000). La rotura de la dormición por escarificación en semillas con dormición fisiológica poco profunda parece estar relacionada al debilitamiento (menor resistencia a la penetración radicular) de la capa de cobertura del embrión, así la radícula puede atravesarla.

En la **dormición combinada** (dormición física y dormición fisiológica) la semilla (o fruto) es impermeable al agua y oxígeno; además, el embrión se encuentra fisiológicamente en dormición. En la mayoría de los casos la dormición fisiológica hallada en estas especies es poco profunda (Baskin y Baskin, 1998).

Estudios realizados en semillas de Buffel Grass indicaron que las accesiones difieren en los atributos de dormición que las semillas poseen, los cuales son una adaptación de esta especie al clima de procedencia (Hacker y Ratcliff, 1989).

En *Cenchrus ciliaris*, las características morfológicas pueden ser las responsables de inhibir la germinación; un ejemplo de ello es la dureza observada en las cubiertas de protección, las cuales se ven incrementadas con la cantidad de luz recibida y por lo tanto con la actividad fotosintética. Alternativamente, distintos tipos de fenoles inhibidores de la germinación pueden variar con la irradiación total (Sharif-Zadeh y Alistair Murdoch, 2000).

Experimentos sobre el efecto de la remoción de lemma y pálea fueron realizados en más de 25 pastos, entre ellos *Agropyron repens*, *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria ruziziensis*, *Cynodon dactylon* y *Dactylis glomerata*. Cada uno de los trabajos implicó la germinación de las unidades de dispersión como de carióspsides desnudas. En todos los casos, la remoción de las estructuras de protección fueron claves para mejorar los porcentajes de germinación de forma significativa (Simpson, 1990).

La influencia que ejercen las cubiertas que protegen a las semillas, como lemma y pálea, fueron clasificadas en: restricción mecánica a la germinación; modificación del requerimiento de luz del embrión; presencia de inhibidores que interfieren la germinación; prevención de la entrada de agua; impedimento en el intercambio gaseoso (Bewley y Black, 1982).

Según Sharif-Zadeh y Alistair Murdoch (2001) la dormición de las cariósides depende tanto de la temperatura ambiente durante la maduración como de la fertilidad y del contenido hídrico de los suelos. El efecto del estrés hídrico sobre la dormición no fue importante cuando las cariósides estuvieron completamente maduras en la planta madre, no así en aquellos que aún se encontraban en formación. En semillas recolectadas de distintos ambientes observaron que los fascículos tienen una germinación menor que las cariósides, indicando el efecto inhibitorio de las estructuras que los rodean.

Además de la participación de las estructuras externas en los mecanismos de dormición, las semillas poseen en sí mismas un importante rol impidiendo la germinación. El cariósido, fruto propio de las *Poaceae* (*Gramineae*), es seco, monospermico e indehisciente. Su pericarpio varía en dureza y en el grado de adherencia a la cubierta seminal (Sendulsky *et al.*, 1986). Tanto el pericarpio como la testa, capas externas de las cariósides, influyen y afectan la emergencia de los embriones en semillas con dormición (Werker, 1981).

Una práctica usual para aumentar la germinación en algunos tipos de semillas es la escarificación. La efectividad del tratamiento en cariósides y su efecto sobre la germinación depende tanto del genotipo como del material vegetal. Hay evidencia indicando que la punción de la cubierta seminal, particularmente en la región cercana al embrión, promueve la germinación en semillas durmientes (Simpson, 1990). En líneas genéticas con dormición embrional profunda, la punción no fue suficiente por sí sola para modificar dicho estado (Simpson, 1978; Cairns y de Villiers, 1986a; Foley, 1987), por lo tanto, luego del tratamiento los embriones escindidos continuaron con dormición (Citado de Simpson, 1990). En otros casos, se demostró un efecto positivo de la germinación a partir de la disrupción de la integridad de las cubiertas seminales mediante la punción del pericarpio y testa. La dormición impuesta por las cubiertas puede ser un fenómeno general de los pastos en la cual hay una considerable

variación genética y ambiental. Dicha expresión eventualmente desaparece durante la post madurez (Simpson, 1990).

Recientemente se ha escarificado químicamente a las unidades de dispersión de Buffel Grass con una solución concentrada de ácido sulfúrico (H_2SO_4) durante 4 minutos, obteniendo una sustancial mejora de la germinación (Bhattari *et al.*, 2008).

Según Loch (1993) la germinación rápida y completa de cariósides se debe a una absorción óptima de agua en ausencia de las cubiertas que constituyen el fascículo. Parihar y Kanodia (1984) no descartan la acción de fenoles en las cubiertas como las causantes del retraso de germinación. Aunque, según Murdoch y Ellis (2000) los componentes que provocan la dormición son propios de las cariósides más que de las estructuras asociadas que lo rodean.

Hacker y Ratcliff (1989) destacaron que las cariósides provenientes de fascículos con más de una cariósida tuvieron más dormición que aquellos fascículos que contenían en su interior un solo cariósida y en consecuencia los porcentajes de germinación de los mismos fueron bajos.

La dormición es un componente que sufre variaciones a través del tiempo. Humphreys (1974) observó que después de cosechar, las semillas de Poáceas permanecen en estado de dormición por períodos que pueden comprender varios meses. Butler (1985) señaló que en *Cenchrus ciliaris* es de corta duración, siendo de cuatro meses el tiempo requerido para que pueda ser superada. Parihar y Pathak (2006) al trabajar en semillas de 14 especies de pastos tropicales perennes señalaron que es máxima en un período dado entre los 3 y los 9 meses. Para el caso de *Cenchrus ciliaris*, *Melinis* y *Panicum antidotale* germinaron al mes de cosechadas pero sus valores fueron bajos, mejorando luego de almacenar 9 meses.

Según Baskin y Baskin (2014) las semillas que poseen dormición fisiológica poco profunda (*non-deep PD*) como el caso de *Cenchrus ciliaris*, frecuentemente pueden superar el estado de dormición una vez maduras (*after ripen*) durante almacenaje en seco (*dry storage*) en temperaturas de habitación. Otras formas de romper dormición como: escisión del embrión, aplicación de ácido giberélico,

estratificación fría (temperatura de 0-10 °C) o caliente (mayor a 15 °C) o escarificación también son aplicadas para estos tipos de semillas.

ISTA (2009) indica para la mayoría de los cereales el almacenaje en seco por 1 a 2 meses y medio a temperatura de entre 10 a 20 °C, como adecuadas para remover la dormición fisiológica. Mientras que en laboratorio, temperaturas superiores a 35 °C en períodos mayores a 1 semana también pueden ser beneficiosas. Experiencias en *Cenchrus ciliaris* sometiendo las semillas a almacenaje en seco por 4 a 12 semanas a 60 °C (Hacker, 1989), a 40 °C (Sharif-Zadeh y Murdoch, 2000) y a 23 °C por 264 días (Palma-Rivero *et al*, 2000) fueron efectivas para eliminar la dormición.

Las bajas temperaturas también son utilizadas para eliminar dormición en aquellas semillas que, luego de ser dispersadas de la planta madre, están expuestas a condiciones invernales. Este proceso puede ser simulado acondicionando las semillas en sustrato humedecido a bajas temperaturas. Tanto el almacenaje en seco como las bajas temperaturas afectan los niveles de hormonas que las semillas poseen. Es así que la dormición es controlada por un balance entre las hormonas que imponen dormición (inhibidoras) y las que estimulan iniciando el crecimiento (promotoras). Las giberelinas son promotoras reconocidas en su función de ruptura de la dormición (ISTA, 2009).

La dormición puede superarse exponiendo las semillas a distintas condiciones durante la realización de los ensayos de germinación. Se han observado estímulos positivos en semillas de Buffel utilizando el preenfriamiento (*prechilling*) (Andersen, 1953), el presecado (*predrying*) (Brown, 1952; Andersen, 1953; Butler, 1985) y el desglumado (Andersen, 1953; Watson, 1955; Parihar y Pathak, 2006).

Según Butler (1985) el humedecimiento con nitrato de potasio (KNO₃) al medio de germinación, no fue favorable como promotor y el preenfriamiento tuvo efectos negativos; resultados similares respecto a las bajas temperaturas fueron expresados por Hacker (1989). El nitrato de potasio (KNO₃) es efectivo para estimular la germinación en semillas dormidas de pastos, acción que realiza estimulando la vía de la pentosa monofosfato, una ruta bioquímica importante en las etapas tempranas de la germinación (ISTA, 2009).

Hacker y Ratcliff (1989) al investigar sobre el efecto de las altas temperaturas y simulando suelos tropicales lograron un aumento de la germinación tratando los fascículos con temperaturas constantes de 60 °C por 4 semanas o alternando temperaturas de 60/25 °C durante 12 semanas. Mientras que condiciones de bajas temperaturas, comunes de ambientes subtropicales como pretratamiento para romper dormición (4 °C) a fascículos secos o humedecidos por 2-8 semanas, no tuvieron efecto. Los fascículos tratados con frío húmedo redujeron la viabilidad considerablemente.

Las Reglas Internacionales de Análisis de Calidad de Semillas (ISTA, 2012) brindan criterios generales para la superación de la dormición en distintas especies, muchas de ellas pertenecientes a la familia Poaceae. Dichos procedimientos deben ser aplicados adicionalmente al ensayo de germinación estándar si la dormición está afectando al lote de semillas. La germinación de una semilla en los ensayos ISTA (2012) implica la emergencia y el desarrollo de una plántula hasta una etapa en la cual el aspecto de las estructuras esenciales indica la posibilidad o no del establecimiento en condiciones favorables de campo. Los tratamientos de ruptura prescritos para cada especie no excluyen que otros tipos de procedimientos, también incluidos en ISTA, puedan ser utilizados.

Los métodos expresados en las reglas ISTA (2012) para romper dormición fisiológica son: pretratamiento frío; pretratamiento calor; almacenaje en seco; fotoperiodo; envoltura de las simientes en recipientes de polietileno; ácido giberélico (AG₃); nitrato de potasio (KNO₃); escarificación ácida y escarificación mecánica. Para dormición causada por cubiertas impermeables indican el remojo, la escarificación mecánica y la escarificación ácida. Por otra parte, para dormición debida a sustancias inhibitorias, el prelavado y la remoción de estructuras que rodean a las semillas son técnicas aconsejadas. Específicamente en *Cenchrus ciliaris* son tres las metodologías sugeridas correspondiendo todas a causas fisiológicas. Las mismas son: el pretratamiento frío, el pretratamiento calor y el tratamiento con KNO₃.

El pretratamiento con frío (*prechilling*) radica en colocar las repeticiones en sustrato humedecido a baja temperatura (5-10 °C) durante 7 días. Transcurrido dicho periodo las mismas son llevadas a cámara de germinación según las condiciones recomendadas para la especie. El pretratamiento calor (*preheating*) consiste en situar

las semillas sin humedecer a temperaturas de 30 a 35 °C en estufa con circulación de aire por 7 días antes de ser llevadas a germinar bajo las condiciones prescritas para un análisis de germinación. El tercer método utiliza la solución de KNO₃ en una concentración del 0,2 % para humedecer el sustrato antes de comenzar el ensayo de germinación.

Las variaciones referidas al tiempo que las semillas permanecen en estado de dormición y las distintas condiciones a las que pueden ser expuestas para que germinen, son muy importantes en el momento que el usuario de semilla necesita conocer la calidad del lote para saber si está apto para la siembra. La realización de un ensayo de viabilidad es independiente de uno de germinación (Wood *et al.* 2005). Sin embargo, puede no haber diferencias entre los porcentajes de viabilidad y germinación sólo en los casos en que la semilla no tiene dormición o semillas duras, o ha sido adecuadamente tratada para eliminar dormición o dureza seminal; no está infectada o ha sido adecuadamente desinfectada; no ha sido tratada con químicos nocivos; no ha brotado o germinado; no ha sido deteriorada durante un test de germinación normal o de duración extendida, o no fueron germinadas bajo condiciones óptimas (ISTA, 2012). En condiciones normales, los resultados obtenidos en los ensayos de poder germinativo y de viabilidad deben ser semejantes aceptándose diferencias del 5 % entre los mismos (Franca Neto, *et al.* 1998).

Al hacer una evaluación de los métodos específicos de ruptura de dormición recomendados por las reglas en *Cenchrus ciliaris*, y teniendo en cuenta que la definición de semilla pura expresada por las normas PSD N°43 “C” (Capítulo II) incluye tanto a fascículos (con o sin carióspsides en su interior) como a carióspsides desprendidos de su estructura de dispersión natural, surgen los interrogantes: ¿serán los tratamientos de ruptura de dormición recomendados por ISTA igualmente efectivos tanto para fascículos como para carióspsides?; ¿cómo responderán algunos de los tratamientos adicionales para *Cenchrus ciliaris*?; ¿de qué manera y con qué precisión contribuye directa o indirectamente, el ensayo de viabilidad por tetrazolio (Capítulo III) al ensayo de poder germinativo?. Tales preguntas surgen de la dificultad de realizar un ensayo de germinación de manera tal que exprese la calidad real del lote de semillas.

Debido a que en *Cenchrus ciliaris* no se han encontrado evidencias del efecto del escarificado mecánico en fascículos (unidad de dispersión) como en semillas (cariópsides) y que dichas técnicas adicionales pueden ser tomadas en cuenta para romper dormición, es que se plantea el siguiente objetivo:

OBJETIVO

Determinar una metodología para la prueba de germinación que mejor exprese la calidad fisiológica en semillas de *Cenchrus ciliaris* L. de los cultivares ‘Texas’ y ‘Biloela’ considerando las siguientes alternativas:

- a- Diferentes tratamientos de preparación de las semillas.
- b- Diferentes tratamientos para evaluar la evolución de la dormición a través del tiempo y la ruptura de la misma.

MATERIALES Y MÉTODOS

Evaluación de la calidad fisiológica (germinación)

Las semillas utilizadas de *Cenchrus ciliaris* ‘Texas’ y ‘Biloela’, fueron cosechadas durante el mes de marzo del año 2014 en la Estación Experimental INTA Deán Funes, Provincia de Córdoba, Argentina. Las mismas se extrajeron de forma manual cuando la especie alcanzó la madurez suficiente para ser utilizada para semilla y antes que los fascículos se desprendan de la planta madre. El material recolectado en los ensayos estuvo compuesto por fascículos, unidad de dispersión natural de *C. ciliaris*.

Las pruebas se iniciaron a los 5 días de realizada la cosecha y se extendieron por un plazo de 9 meses, con intervalos de 3 meses entre ensayo. Siendo de esta manera cuatro los momentos de evaluación en cada cultivar (0, 3, 6 y 9 meses post cosecha).

Las condiciones para los ensayos de germinación se obtuvieron del protocolo descrito para la especie por las reglas ISTA (2012). La temperatura fue alternada de 20<=>30 °C, correspondiendo la temperatura más baja al ciclo de noche (16 horas) y la más alta al ciclo de día (8 horas); el sustrato de germinación usado fue TP (top paper=sobre papel) y S (sand=arena). El papel utilizado fue Valot Supreme Premium, hojas de 18,5 x 22 cm y una capacidad de retención de agua de 4 ml por gramo de papel. El medio de crecimiento arena tuvo una capacidad de retención de agua de 0,18 ml/gr de arena. Las repeticiones fueron sembradas en bandejas de germinación plásticas de 26 x 19 x 5 cm para la siembra en papel, y de 14 x 14 cm (tipo speedling) para arena. Luego cada repetición se colocó bolsas de polietileno para evitar la pérdida de humedad. Se aplicaron los pretratamientos de ruptura de dormición indicados para *Cenchrus ciliaris* por las reglas ISTA (2012) y los propuestos en los experimentos de esta investigación.

Los conteos de plántulas normales se realizaron a los 7 días y 28 días según lo recomendado por las reglas. Además, para evaluar el progreso de la germinación a través del tiempo se efectuaron conteos intermedios a los 14 y 21 días. Las plántulas fueron evaluadas según el Manual de Evaluación de Plántulas (ISTA, 2009). Al final de los ensayos los valores de cada uno de los conteos fueron sumados y expresados como porcentaje de Poder Germinativo (% PG).

Se tomaron en consideración dos aspectos principales que responden a los objetivos fijados para este trabajo:

1)-Alternativas de preparación de las semillas para el análisis de germinación.

Fueron consideradas cuatro tipos de preparaciones o materiales para utilizar como semilla:

- a- Fascículos intactos o Testigo (**F**) (reglas ISTA).
- b- Fascículos escarificados (**FE**).
- c- Cariópsides intactas (**C**).
- d- Cariópsides escarificadas (**CE**).

La figura 4.1 muestra los tipos de preparaciones realizadas a las semillas para los ensayos de germinación.

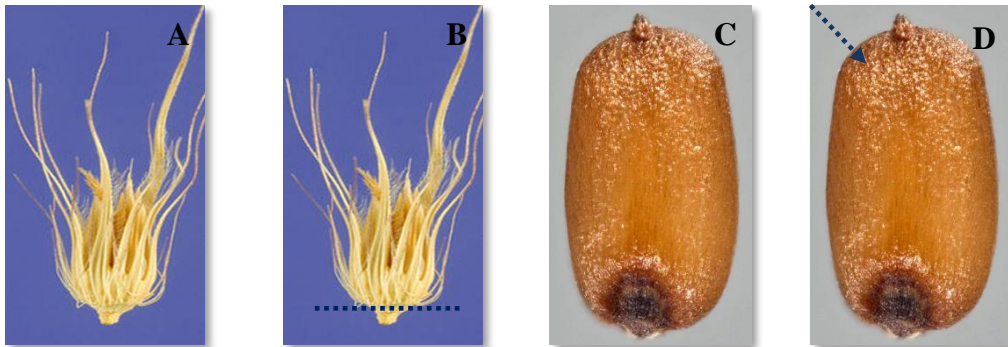


Fig. 4.1 Alternativas de preparación de semillas para la germinación de *Cenchrus ciliaris* **A)** fascículo intacto **B)** fascículo escarificado **C)** cariópside intacta **D)** cariópside escarificada. Con línea punteada se indica el sitio de corte (fascículos) y el sitio de punción (cariópsides).

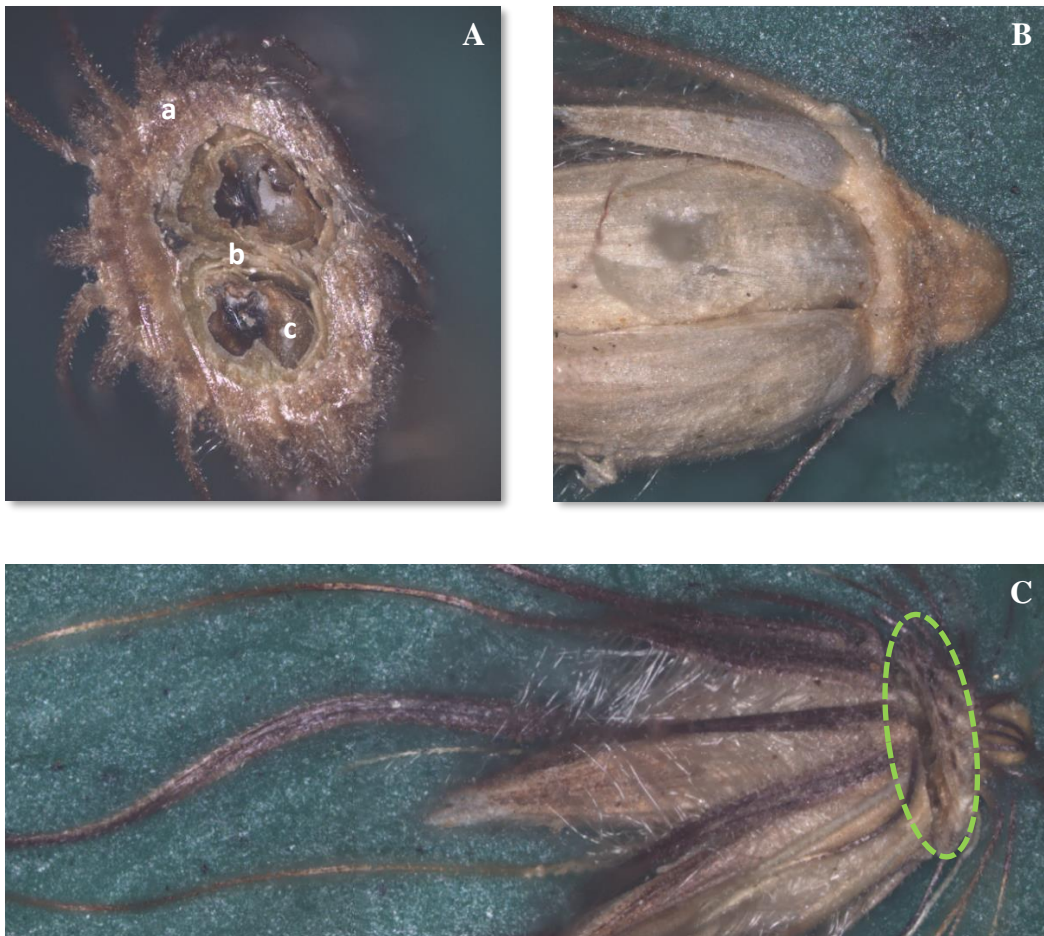


Fig. 4.2 **A)** Corte transversal realizado en fascículo de *Cenchrus ciliaris* **a)** estructuras de protección del involucro (setas); **b)** glumas, lemmas y páleas; **c)** cariópside. **B)** espiguilla luego de ser retiradas las estructuras que forman el involucro. **C)** Fascículo

escarificado de *Cenchrus ciliaris*. Con circunferencia verde se destaca el sitio de corte realizado con bisturí en la región basal del fascículo.

El escarificado de fascículos se realizó mediante un corte transversal completo en la región basal y proximal de la inserción del fascículo, región donde se ubican las cariósides, tratando de no producir daño alguno en ellos (Figura 4.2 C). En cariósides, el escarificado se efectuó con aguja en la región distal del fruto-semilla de manera de evitar daños en la región embrionaria (Figura 4.1 D). La extracción de las cariósides de sus estructuras de protección se realizó en cada momento de evaluación, siendo fascículos la forma de almacenaje.

2)- *Alternativas de pretratamientos para estudiar la evolución de la dormición en el tiempo.*

Las condiciones en las cuales se condujo cada uno de los ensayos fueron las siguientes:

- **Testigo:** los fascículos y cariósides fueron sembrados sin pretratamiento.
- **Pretratamiento frío:** se realizó a fascículos y cariósides con temperatura de 5 a 10 °C durante 7 días (ISTA, 2012).
- **Pretratamiento calor:** se aplicó a fascículos y cariósides utilizando temperatura de 35 °C durante 7 días (ISTA, 2012).
- **Nitrato de potasio (KNO₃):** se realizó tanto en fascículos como en cariósides. Sustrato de germinación humedecido con una solución de KNO₃ al 0,2 % (ISTA, 2012).
- **Ácido giberélico (AG₃):** se usó como pretratamiento para fascículos y para cariósides. Se humedeció el sustrato con una solución de ácido giberélico al 0,05 %.

Se utilizaron 4 repeticiones de 25 semillas para cada tratamiento (combinación de un tipo de preparación de semillas con una condición de ensayo (Tabla 4.1). Todas las semillas fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 1 % y luego enjuagadas con abundante agua destilada para eliminar residuos de la solución.

Tabla 4.1 Combinación de alternativas de preparación de semillas y de pretratamientos utilizados en los ensayos de germinación de *Cenchrus ciliaris* ‘Texas’ y ‘Biloela’. **F**: fascículos; **FE**: fascículos escarificados; **C**: carióspsides; **CE**: carióspsides escarificadas.

	Testigo	Pre tratamiento frío	Pre tratamiento calor	KNO ₃	AG ₃
F	F testigo	F frío	F calor	F nitrato	F giberélico
FE	FE testigo	FE frío	FE calor	FE nitrato	FE giberélico
C	C testigo	C frío	C calor	C nitrato	C giberélico
CE	CE testigo	CE frío	CE calor	CE nitrato	CE giberélico

De manera simultánea a la realización de los análisis de germinación, se determinó para cada uno de los cultivares ensayados el porcentaje de fascículos llenos (% LI), utilizando la metodología descrita en el Capítulo II; y el porcentaje de viabilidad por tetrazolio (% viabilidad por TZ) desarrollado en el Capítulo III. Con los datos obtenidos (calidad física, viabilidad por tetrazolio y germinación) se procedió a integrar los resultados para una correcta expresión e interpretación de los mismos.

‘Texas’ tuvo los siguientes parámetros iniciales de calidad:

Porcentaje de fascículos llenos (% LI): 45 % (**A**)

Viabilidad de carióspsides: 85 % (**B**)

Viabilidad ajustada (**A x B**): 38 %

Peso de 1.000 fascículos: 1,996 gr

Cantidad de fascículos por Kg: 501.000

Cantidad de fascículos viables por Kg: 190.400 (Viabilidad ajustada 38 %)

‘**Biloela**’ expresó los siguientes parámetros iniciales de calidad:

Porcentaje de fascículos llenos (% LI): 22 % (**A**)

Viabilidad de cariósides: 88 % (**B**)

Viabilidad ajustada (**A x B**): 19 %

Peso de 1.000 fascículos: 1,5678 gr

Cantidad de fascículos por Kg: 637.800

Cantidad de fascículos viables por Kg: 121.180 (Viabilidad ajustada: 19 %)

Los valores de referencia mínimos para la comercialización de *Cenchrus ciliaris* de INASE para la República Argentina son los siguientes: poder germinativo: 20 %; viabilidad por tetrazolio: 35 % (Anexo N° I).

Diseño experimental y análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2015) desarrollado por la cátedra de Estadística y Biometría de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC.

En todos los casos el análisis estadístico fue para cada cultivar estudiado y se realizó separadamente en cada tipo de medio de germinación (medio de crecimiento papel y arena). Para comparar las medias de los tratamientos, se aplicó la técnica del análisis de la varianza. En cada análisis, se incluyó el factor tipo de semilla (fascículos; fascículos escarificados; cariósides y cariósides escarificadas), el factor condición de germinación (testigo, pretratamiento frío, pretratamiento calor, nitrato de potasio, ácido giberélico) y la interacción entre ambos factores, para un diseño completamente aleatorizado.

Dado que la evaluación fue realizada sobre las mismas unidades experimentales a lo largo del tiempo, para considerar la correlación entre las observaciones provenientes de una misma unidad experimental, se probaron modelos en los que la estructura de medias fue la indicada anteriormente y se diferenciaban de la estructura de correlación temporal. Los modelos fueron comparados en base a los criterios de información de Akaike (AIC) y Bayesiano (BIC), para identificar al mejor ajuste.

El modelo general puede expresarse como:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \varepsilon_{ijkl}$$

donde:

Y_{ijkl} representa la respuesta de la l -ésima repetición en el i -ésimo nivel del factor genotipo, j -ésimo nivel de factor material y k -ésimo nivel del factor pretratamiento.

μ representa una media general, porcentaje de germinación.

α_i el efecto que produce el i -ésimo nivel del factor genotipo.

β_j corresponde al efecto del j -ésimo nivel del factor material o tipo de semilla.

γ_k corresponde al efecto del k -ésimo nivel del factor pretratamiento.

$(\alpha\beta)_{ij}$ el efecto interacción para la combinación del nivel i -ésimo del factor genotipo, j -ésimo del factor material.

$(\alpha\gamma)_{ik}$ el efecto interacción para la combinación del nivel i -ésimo del factor genotipo y k -ésimo del factor pretratamiento.

$(\beta\gamma)_{jk}$ el efecto interacción para la combinación del nivel j -ésimo del factor material y k -ésimo del factor pretratamiento.

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ el efecto interacción para la combinación del nivel i -ésimo del factor genotipo, j -ésimo del factor material y k -ésimo del factor pretratamiento.

ε_{ijkl} es el error aleatorio asociado a la observación $ijkl$ -ésima con $\varepsilon_{ijk} \sim N(0, \sigma^2)$.

Los tratamientos a comparar quedaron definidos por las combinaciones de los niveles de los factores, resultando un total de 20 tratamientos. Debido a la cantidad de condiciones experimentales estudiadas, para comparar las medias se utilizó la prueba DGC (Di Rienzo *et al.*, 2002), recomendada para la comparación de 5 o más medias. En todos los análisis el nivel de significación se fijó en 5 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al comparar los resultados obtenidos entre fascículos y cariósides, los porcentajes de germinación de éstos últimos se ajustaron por el porcentaje de fascículos llenos que el material expresó en el análisis de calidad física. Por ejemplo, para *Cenchrus ciliaris* 'Texas' valores de germinación del 20 % en cariósides, se ajustaron por el porcentaje de fascículos llenos propio del lote (45 %) siendo en consecuencia 9 % el porcentaje de germinación ajustada.

Respecto a la siembra realizada en medio de crecimiento arena, concluido el primer momento de evaluación, se observó una serie de inconvenientes por lo cual se decidió descartar el sustrato. Dichos inconvenientes fueron:

- 1- El sustrato no favoreció la expresión de la germinación en ninguno de los cultivares.
- 2- La evaluación de cariósides se dificultó debido a su tamaño reducido y al color, que hace complicada la individualización de los mismos en el sustrato arena.
- 3- Se requieren grandes volúmenes de soluciones de nitrato de potasio y ácido giberélico para humedecer el sustrato.

Germinación

Dada la cantidad de tratamientos evaluados, al presentar los resultados se hace referencia a grupos de germinación, de modo que dentro de cada grupo se encuentran tratamientos que no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre sí pero que se diferenciaron de los tratamientos que pertenecen a otro grupo. A su vez, la descripción de resultados se realiza para cada momento de observación (0, 3, 6 y 9 meses de almacenamiento). En las figuras, que ilustran los resultados de las comparaciones de medias, los tratamientos de igual performance (grupo) fueron encerrados por cajas rectangulares e identificados con letras (A, B, C y D).

***Cenchrus ciliaris* 'Texas'. Sin almacenamiento**

La Figura 4.3 muestra los porcentajes de germinación durante el transcurso del ensayo para cada uno de los tratamientos aplicados a los materiales sembrados inmediatamente luego de la cosecha y los grupos de germinación formados para cada conteo.

Allí se observó que:

- Los fascículos intactos tuvieron el peor desempeño, quedando muy alejada la germinación del mínimo comercial establecido para la especie.
- Los fascículos escarificados expresaron una germinación superior a los fascículos sin escarificar, siendo el tratamiento con AG₃ el único que superó el mínimo para la comercialización.
- Las cariósides intactas tuvieron una germinación variable con los tratamientos aplicados. Aquellos en los cuales se aplicó AG₃ y KNO₃ fueron los que alcanzaron y superaron el mínimo comercial.
- La escarificación de cariósides resultó ser el mejor tratamiento de preparación de semillas obteniendo los porcentajes de germinación más elevados. Dentro de estos materiales las cariósides tratadas con AG₃ fueron los únicos que alcanzaron la viabilidad ajustada por tetrazolio.

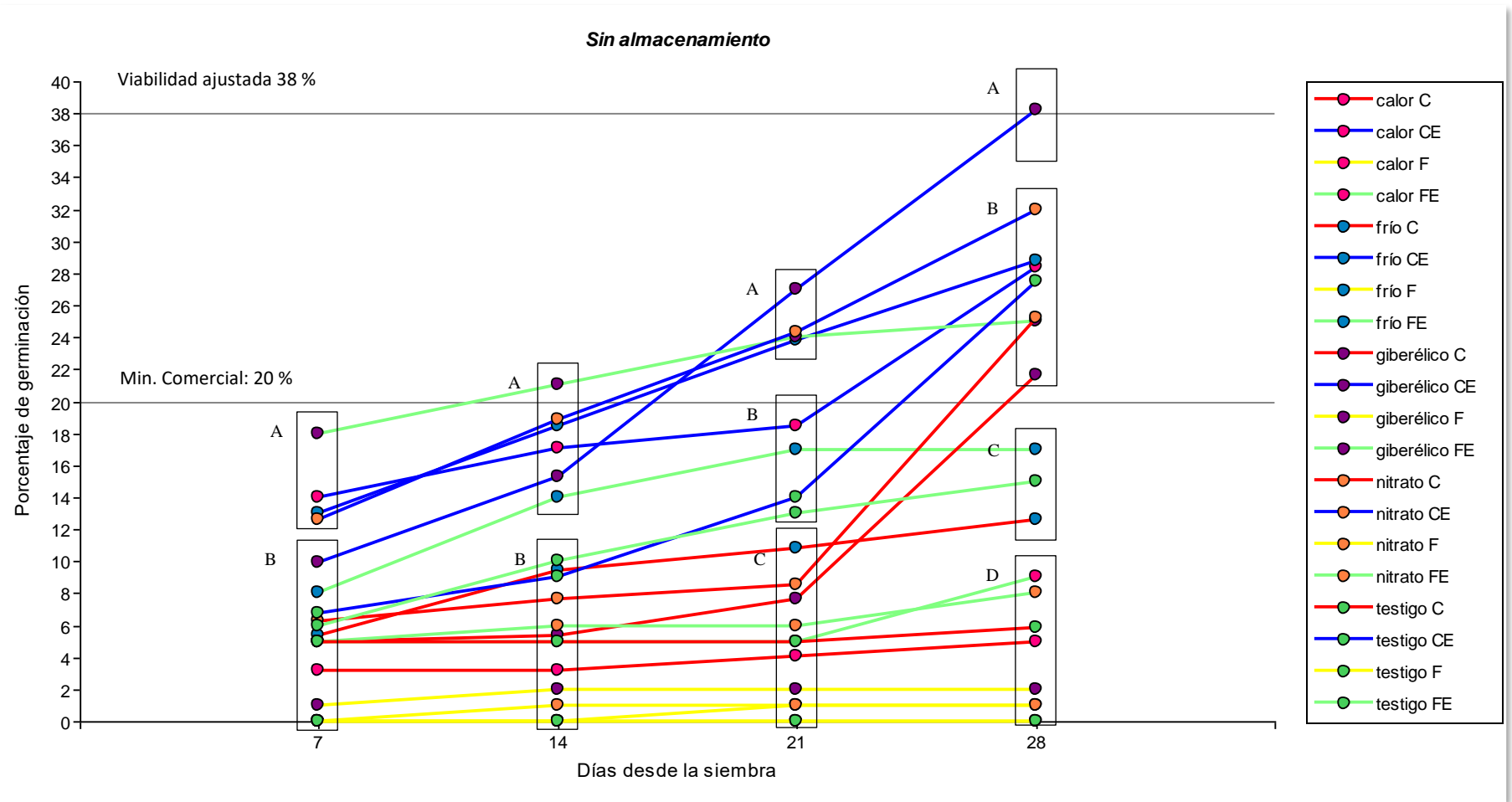


Fig. 4.3 Porcentaje de germinación en *Cenchrus ciliaris* 'Texas' sin almacenamiento para las combinaciones de materiales y tratamientos utilizados. Líneas de colores muestran materiales. **C**: carióspsides (rojo); **CE**: carióspsides escarificadas (azul); **F**: fascículos (amarillo); **FE**: fascículos escarificadas (verde) y con círculos los tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). En cada día de evaluación letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En base a los resultados se pudo determinar que los comportamientos germinativos pueden explicarse principalmente por el tipo o forma de preparación de las semillas, más que por los pretratamientos realizados. La figura 4.4 muestra los distintos grupos de germinación (A, B, C, D) al final del ensayo, coloreado según el tipo de preparación del material. Es de notar que el tipo de material más promisorio correspondió a las cariósides escarificadas (barras color azul).

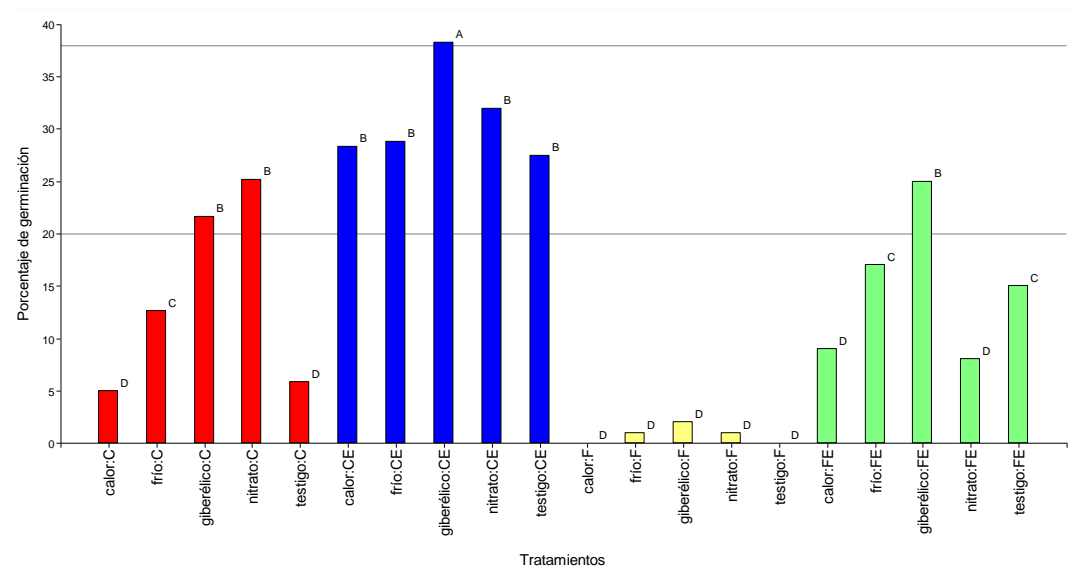


Fig. 4.4 Grupos de germinación formados al día 28 por distintos tipos de materiales de *Cenchrus ciliaris* 'Texas' sin almacenamiento. **C**: cariósides (rojo); **CE**: cariósides escarificadas (azul); **F**: fascículos (amarillo); **FE**: fascículos escarificados (verde) y la aplicación en ellos de tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Acorde a dicha tendencia, para esclarecer el efecto que el tipo de preparación de material ejerce, se construyeron perfiles promedios que resumen el comportamiento de cada material a través del tiempo (Figura 4.5). De esta forma, con cariósides escarificadas se obtuvieron los mejores porcentajes de germinación (31 %). Por otra parte, cariósides y los fascículos escarificados exhibieron valores finales, ambos, cercanos al 15 %, mientras que los fascículos intactos tuvieron porcentajes de germinación del 1 %.

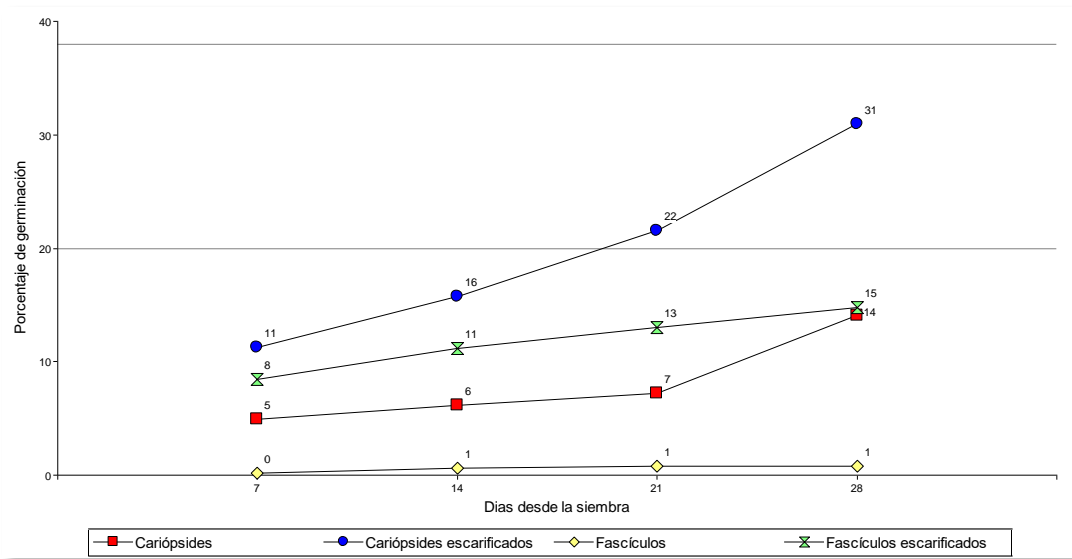


Fig. 4.5 Curvas de germinación promedio para materiales de *Cenchrus ciliaris* 'Texas' sin almacenamiento sometidos a diferentes tratamientos pregerminativos.

***Cenchrus ciliaris* 'Biloela'. Sin almacenamiento**

La Figura 4.6 muestra el desempeño de cariópsides sembradas inmediatamente luego de cosechadas en los distintos tipos de tratamientos aplicados y la evolución de los mismos en el transcurso de 28 días de ensayo. La misma reveló que:

- La germinación de los fascículos intactos fue escasa en todos los pretratamientos germinativos utilizados.
- Los fascículos escarificados presentaron una germinación apenas superior al mismo material sin escarificar.
- Las cariópsides intactas tuvieron un desempeño germinativo similar a los fascículos intactos. Los pretratamientos germinativos no tuvieron una respuesta positiva en la germinación de estos materiales.
- La mayor germinación se obtuvo con las cariópsides escarificadas, los cuales a lo largo del período de ensayo manifestaron un incremento progresivo de

germinación. Sólo el tratamiento con KNO_3 tuvo un desempeño más bajo respecto al resto de los tratamientos, inclusive del testigo.

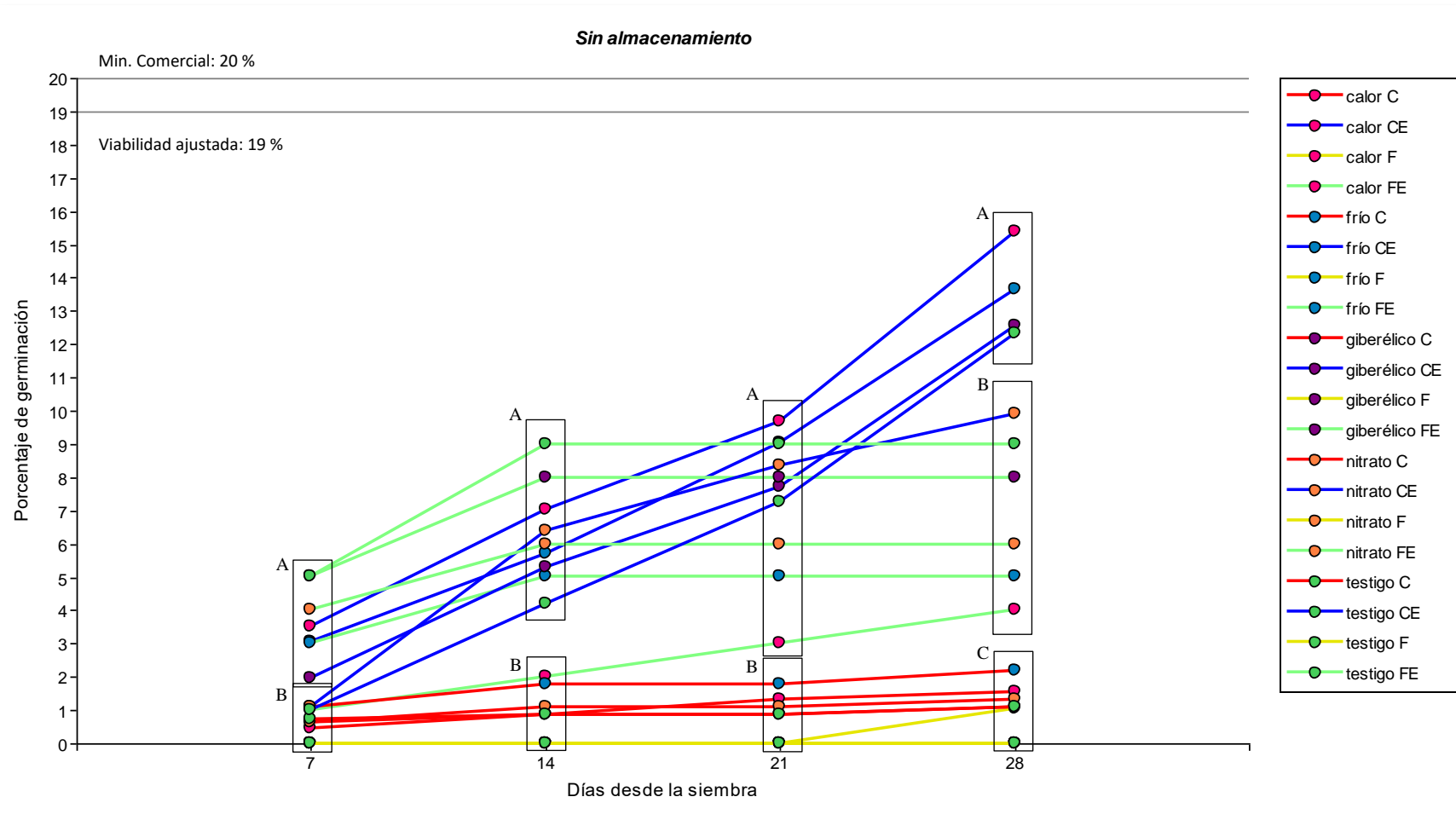


Fig. 4.6 Porcentaje de germinación en *Cenchrus ciliaris* 'Biloela' sin almacenamiento para las combinaciones de materiales y tratamientos utilizados. Líneas de colores muestran materiales. **C**: carióspsides (rojo); **CE**: carióspsides escarificados (azul); **F**: fascículos (amarillo); **FE**: fascículos escarificados (verde) y con círculos los tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). En cada día de evaluación letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el día 28, se pudieron separar tres grupos de acuerdo al poder germinativo. El primero, con 12 al 15 %, estuvo conformado por carióspsides escarificadas (testigo, frío, calor y AG₃). El segundo, de germinación intermedia, (4 - 10 %) por carióspsides escarificadas (KNO₃) y todos los pretratamientos expuestos a los fascículos escarificados. Mientras que el grupo C quedó dado por carióspsides y fascículos intactos en todos sus tratamientos (Figura 4.6 y 4.7).

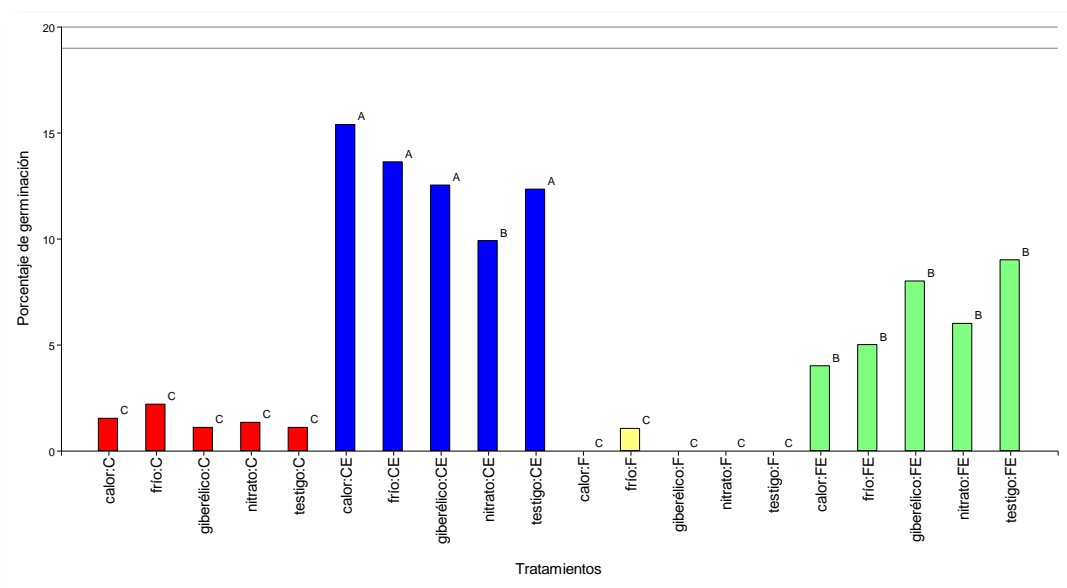


Fig. 4.7 Grupos de germinación formados al día 28 por distintos tipos de materiales de *Cenchrus ciliaris* 'Biloela' sin almacenamiento. **C**: carióspsides (rojo); **CE**: carióspsides escarificadas (azul); **F**: fascículos (amarillo); **FE**: fascículos escarificados (verde) y la aplicación en ellos de tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La figura 4.8 muestra la evolución de la germinación de distintos materiales, en ella se destaca la escasa respuesta germinativa de las semillas sin escarificar. Por otra parte, las carióspsides escarificadas expresaron, en promedio, una mayor germinación (13 %).

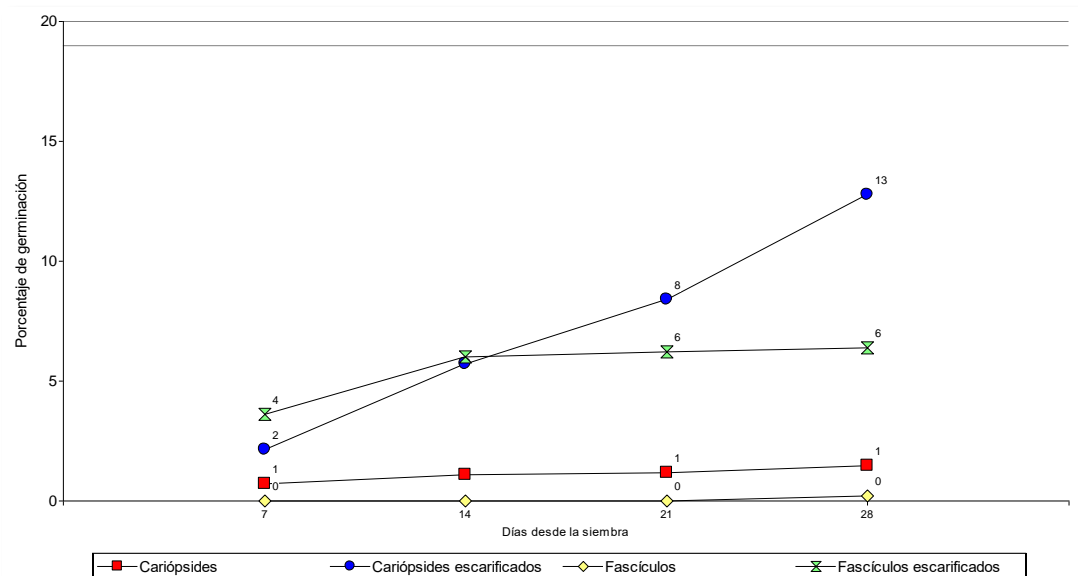


Fig. 4.8. Curvas de germinación promedio para materiales de *Cenchrus ciliaris* ‘Biloela’ sin almacenamiento sometidos a diferentes tratamientos pregerminativos.

Los porcentajes de germinación expresados en cada uno de los momentos de evaluación referenciaron un comportamiento semejante tanto en *Cenchrus ciliaris* ‘Texas’ como ‘Biloela’. En tal sentido se realizó un ANAVA utilizando un modelo lineal y mixto. En el modelo se incluyeron los factores materiales, tratamiento, cultivar y la interacción entre ellos. La variable utilizada en el modelo fue la diferencia porcentual promedio entre la viabilidad ajustada de cada cultivar (valor de referencia) y la germinación lograda o alcanzada durante el análisis. De esta manera, la diferencia porcentual respecto al óptimo permitió la comparación del efecto de la utilización de distintos materiales (cariópsides, cariópsides escarificadas, fascículos y fascículos escarificados) y la aplicación de los tratamientos germinativos (testigo, frío, calor, KNO_3 y AG_3) en ambos cultivares durante los cuatro momentos de evaluación (0, 3, 6 y 9 meses). Anexo II.

La evaluación de las semillas sin almacenamiento mostró un aumento progresivo de los porcentajes de germinación durante los 28 días de ensayo, siendo los materiales compuestos por cariópsides escarificadas los que presentaron porcentajes de germinación más próximos a la viabilidad ajustada y esto ocurrió tanto en *Cenchrus ciliaris* ‘Texas’ como en ‘Biloela’. Las cariópsides intactas, fascículos intactos y fascículos escarificados, manifestaron una germinación significativamente

menor, independientemente de las condiciones a las que se expusieron las semillas (testigo, pretratamiento frío, pretratamiento calor, KNO_3 y AG_3). De todas las formas de preparación los fascículos intactos fueron los de peor desempeño, no superando el 2 % de germinación. Las condiciones dadas a éstos no fueron suficientes para que el proceso germinativo pudiera desencadenarse, inclusive utilizando los pretratamientos para ruptura de dormición sugeridos por las reglas ISTA (2012).

En cariósides escarificadas los resultados de germinación logrados en el momento inmediato a cosecha (sin almacenamiento) fueron de un 27 a un 38 % (Figura 4.4) para *Cenchrus ciliaris* ‘Texas’ tomando como valor de referencia la viabilidad ajustada (38 %), mientras que en ‘Biloela’, los resultados de la germinación de cariósides escarificadas estuvieron entre un 10 a un 15 % con una viabilidad ajustada de 19 % (Figura 4.7). Por lo tanto, la germinación (sin ajustar) de un 65 al 100 % en cariósides de ‘Texas’ y del 63 al 79 % en ‘Biloela’, indica que la escarificación de cariósides promueve la germinación en *Cenchrus ciliaris* en el período inmediato a la cosecha. De esta forma, durante la primer evaluación se observó interacción triple dada entre genotipo (cultivar), material y tratamiento germinativo ($p=0,0609$). Así, la respuesta de cada cultivar dependió del tipo de preparación del material utilizado y de los pretratamientos a los que se expusieron las semillas. En los ensayos sin almacenamiento, las cariósides escarificadas (CE) afectaron de manera significativa la germinación, obteniendo los porcentajes más elevados (Figura 4.9). Este material quedó en el rango del -1 al 40 % de diferencia respecto a la germinación alcanzable. El único tratamiento que no se comportó de manera similar al resto de los CE estuvo dado por KNO_3 ‘Biloela’ con un 47 % de diferencia respecto al valor esperado. Por otra parte, cariósides escarificadas tratadas con AG_3 en ‘Texas’ fueron los que más se aproximaron a los valores de referencia.

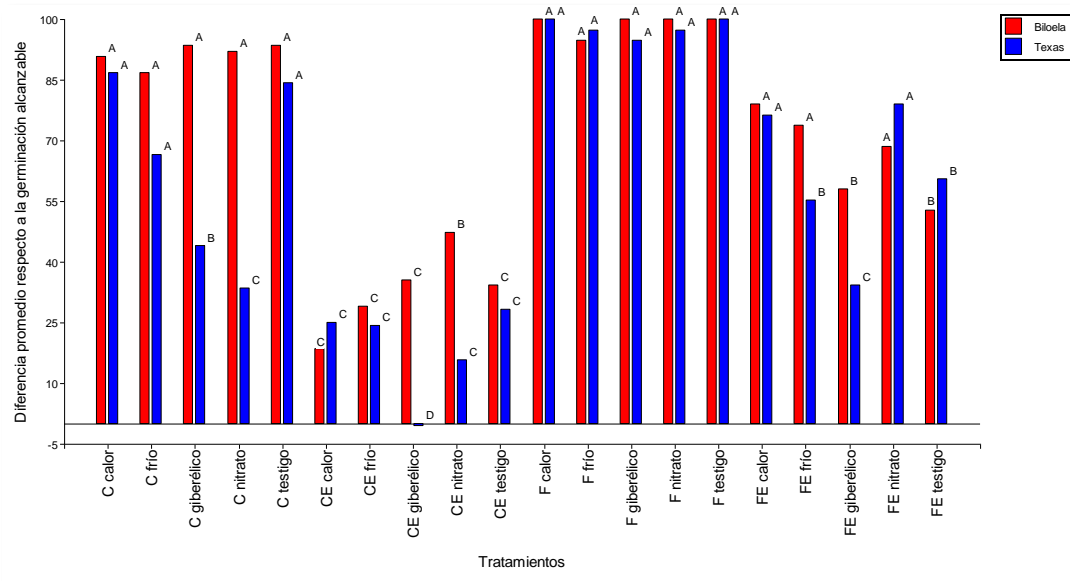


Fig. 4.9 Diferencia promedio respecto a la germinación alcanzable de distintos tratamientos germinativos aplicados a semillas de *Cenchrus ciliaris* ‘Texas’ y ‘Biloela’. Sin almacenamiento.

Cenchrus ciliaris ‘Texas’ con 3 meses de almacenamiento

La Figura 4.10 detalla el comportamiento de cada tratamiento germinativo en el segundo momento de evaluación. El análisis de los grupos formados durante los 28 días de análisis indicó que:

- Los fascículos intactos tuvieron una germinación superior comparado con el momento previo de evaluación, pero sin alcanzar el mínimo de germinación requerido para la comercialización.
- Los fascículos respondieron de manera positiva a la escarificación, como lo muestra el tratamiento FE, sólo el material pretratado con frío no superó el 20 % de germinación.
- Cariópsides y cariópsides escarificadas lograron en 7 días valores satisfactorios de germinación (superiores al 20 %) y próximos a la viabilidad

estimada (38 %), sin manifestar variaciones luego de los 14 días desde la siembra.

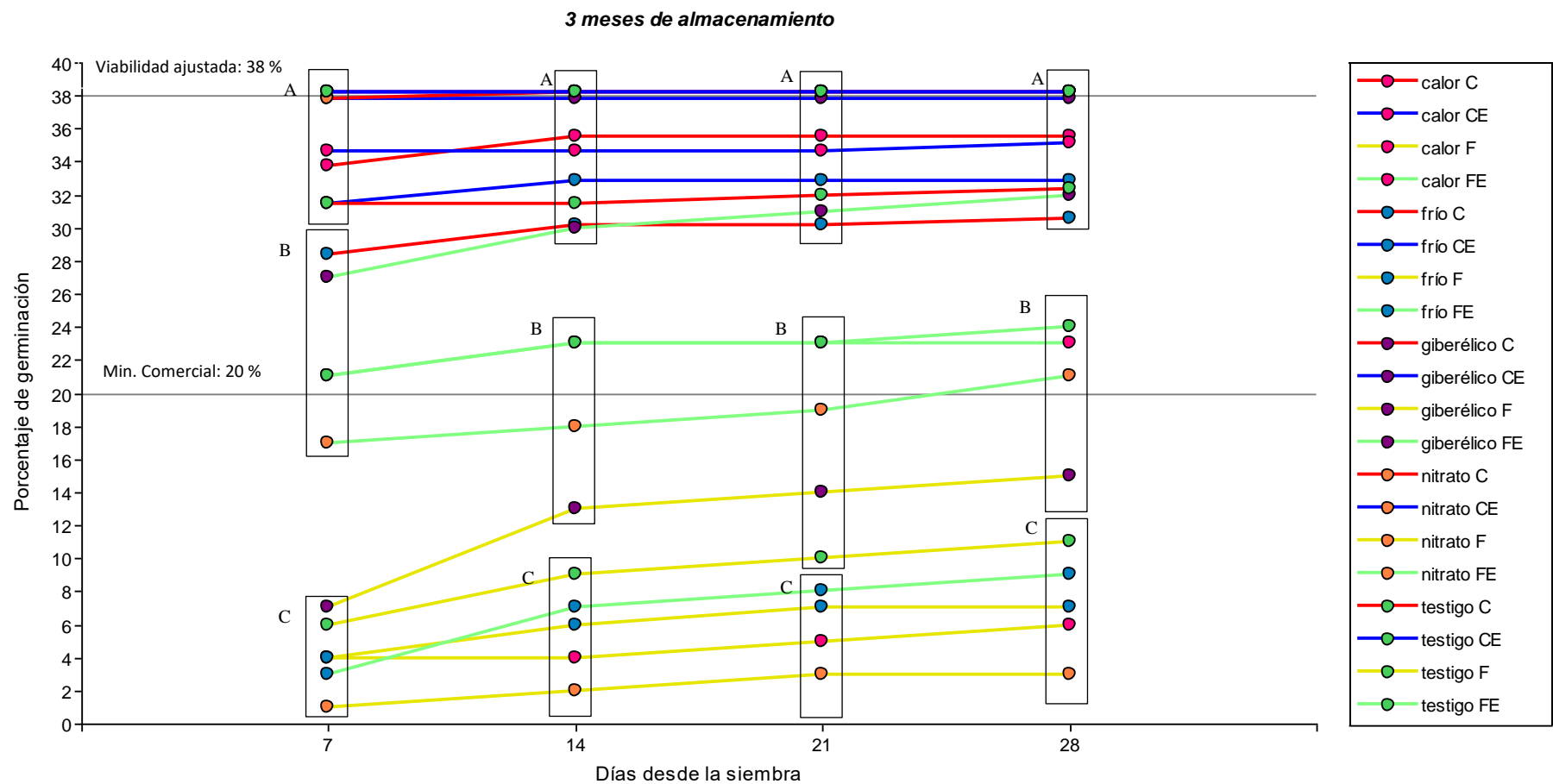


Fig. 4.10 Porcentaje de germinación en *Cenchrus ciliaris* 'Texas' con tres meses de almacenamiento para las combinaciones de materiales y tratamientos utilizados. Líneas de colores muestran materiales. **C**: cariósides (rojo); **CE**: cariósides escarificadas (azul); **F**: fascículos (amarillo); **FE**: fascículos escarificados (verde) y con círculos los tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). En cada día de evaluación letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La Figura 4.11 corresponde a la evaluación del día 28. Se observa que el desempeño de carióspsides igualó a carióspsides escarificadas, en todos los pretratamientos (testigo, frío, calor, KNO₃, AG₃) y que estos materiales junto a fascículos escarificados y tratados con AG₃, fueron los de mayor germinación con porcentajes de plántulas normales de 31 al 38 %.

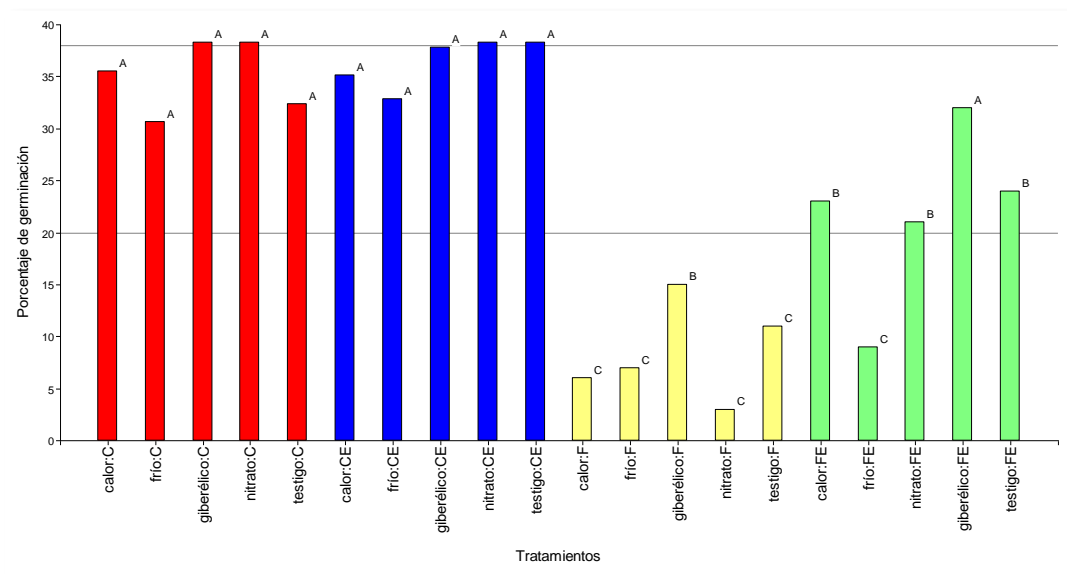


Fig. 4.11 Grupos de germinación formados al día 28 por distintos tipos de materiales de *Cenchrus ciliaris* 'Texas' con tres meses de almacenamiento. **C**: carióspsides (rojo); **CE**: carióspsides escarificadas (azul); **F**: fascículos (amarillo); **FE**: fascículos escarificados (verde) y la aplicación en ellos de tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la Figura 4.12 se observa la evolución de la germinación de cada uno de los materiales, como promedio de todos los tratamientos. Tanto las carióspsides como carióspsides escarificadas alcanzaron el porcentaje de viabilidad ajustada por tetrazolio (38 %) y superaron considerablemente el estándar de comercialización (20 %). Los fascículos escarificados, si bien lograron valores superiores al límite comercial, quedaron debajo del porcentaje de viabilidad ajustada. Los fascículos intactos mejoraron el desempeño respecto al momento 1 (sin almacenamiento) pero la germinación estuvo distante de la calidad de referencia ajustada por TZ.

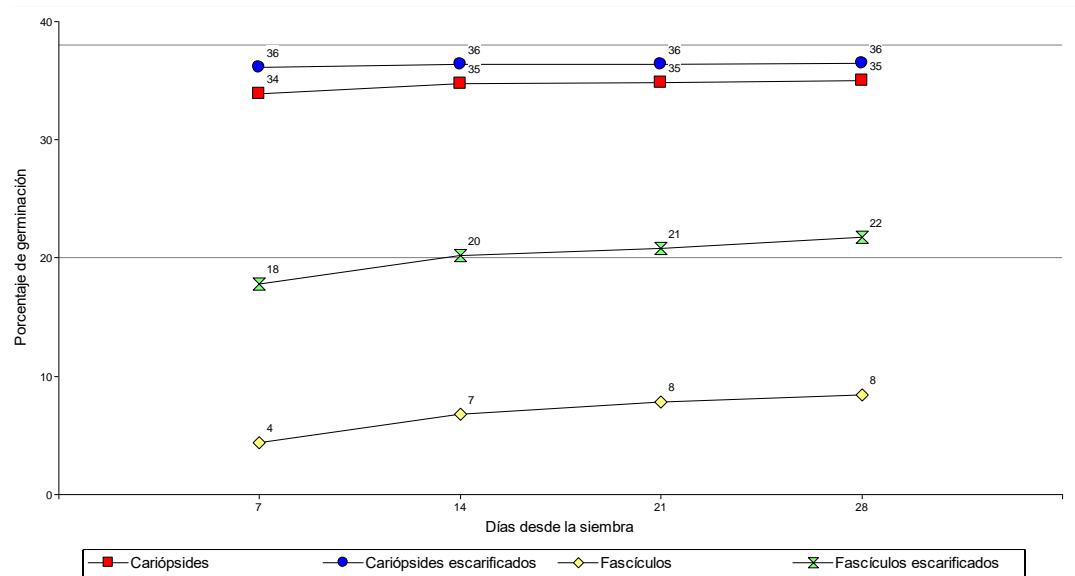


Fig. 4.12 Curvas de germinación promedio para materiales de *Cenchrus ciliaris* 'Texas' con tres meses de almacenamiento sometidos a diferentes tratamientos pregerminativos.

Cenchrus ciliaris 'Biloela' con 3 meses de almacenamiento

En la evaluación correspondiente a los 3 meses de almacenamiento se formaron 2 grupos de germinación que se constituyeron el día 7 y se mantuvieron hasta el día 28 cuando finalizaron los ensayos (Figura 4.13). En ella se destaca que:

- Los fascículos y los fascículos escarificados (testigo y KNO_3) presentaron una germinación poco destacada no manifestando un aumento considerable de la germinación.
- Los materiales correspondientes a cariópsides, con y sin escarificación, y a fascículos escarificados (frío, calor, AG_3) conformaron el grupo A, siendo éste el de mayor germinación. Estas semillas alcanzaron en 7 días el valor potencial de germinación establecido por el ensayo de viabilidad (19 %).

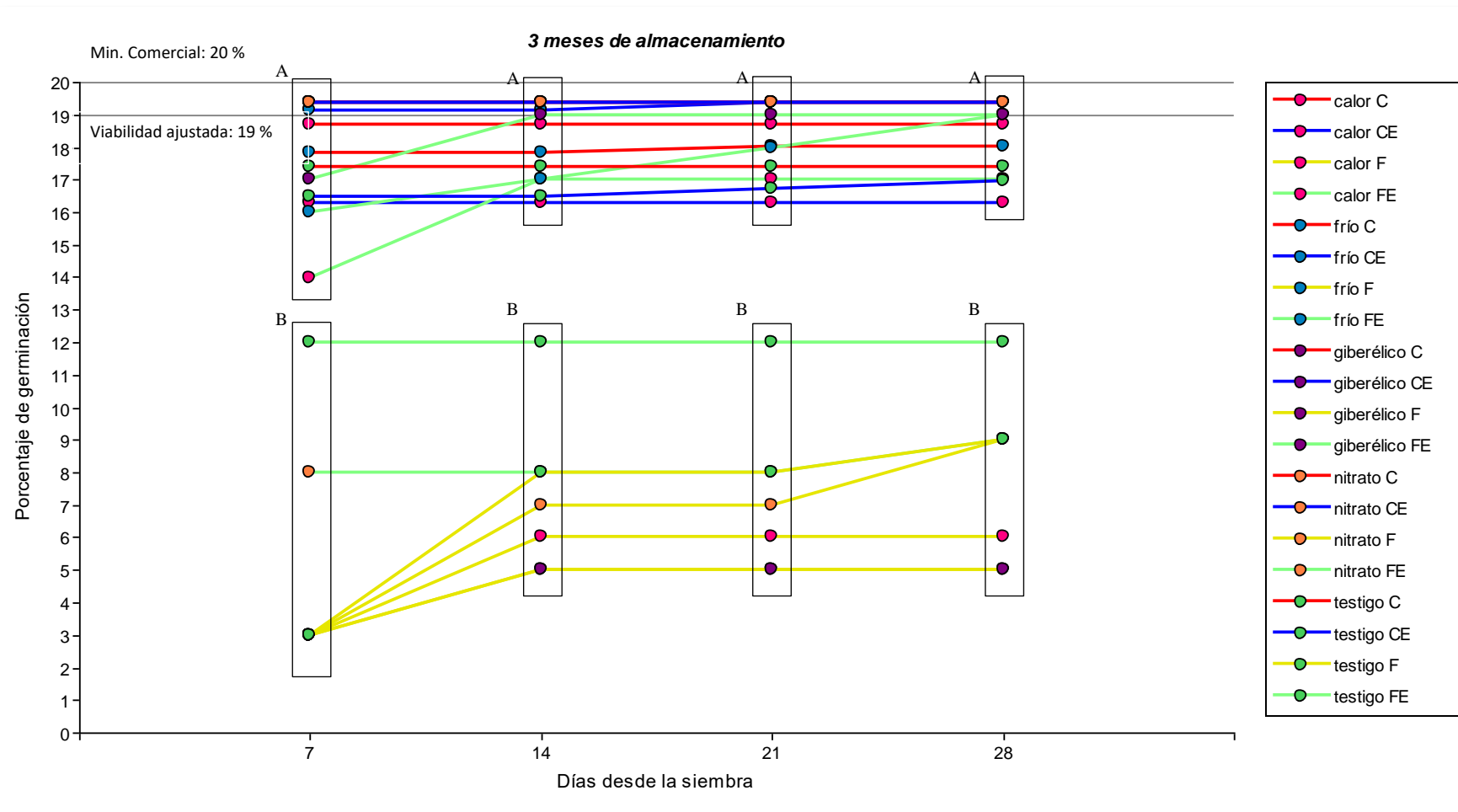


Fig. 4.13 Porcentaje de germinación en *Cenchrus ciliaris* 'Biloela' con tres meses de almacenamiento para las combinaciones de materiales y tratamientos utilizados. Líneas de colores muestran materiales. **C**: carióspsides (rojo); **CE**: carióspsides escarificadas (azul); **F**: fascículos (amarillo); **FE**: fascículos escarificados (verde) y con círculos los tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). En cada día de evaluación letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En la evaluación realizada el día 28 se pudo observar la formación de dos grupos de germinación. El grupo A tuvo valores entre 16 y 19 %, próximos a la viabilidad ajustada determinada por tetrazolio (19 %). Los materiales de este grupo fueron cariósides y cariósides escarificadas ambos en todos los tratamientos, y fascículos escarificados con tratamientos de frío, calor, AG₃. El grupo B formado por todos los tratamientos de fascículos y por fascículos escarificados con tratamientos de testigo y KNO₃, presentó una germinación del 5 al 12 % no manifestando una mejora durante el período indicado (Figura 4.14).

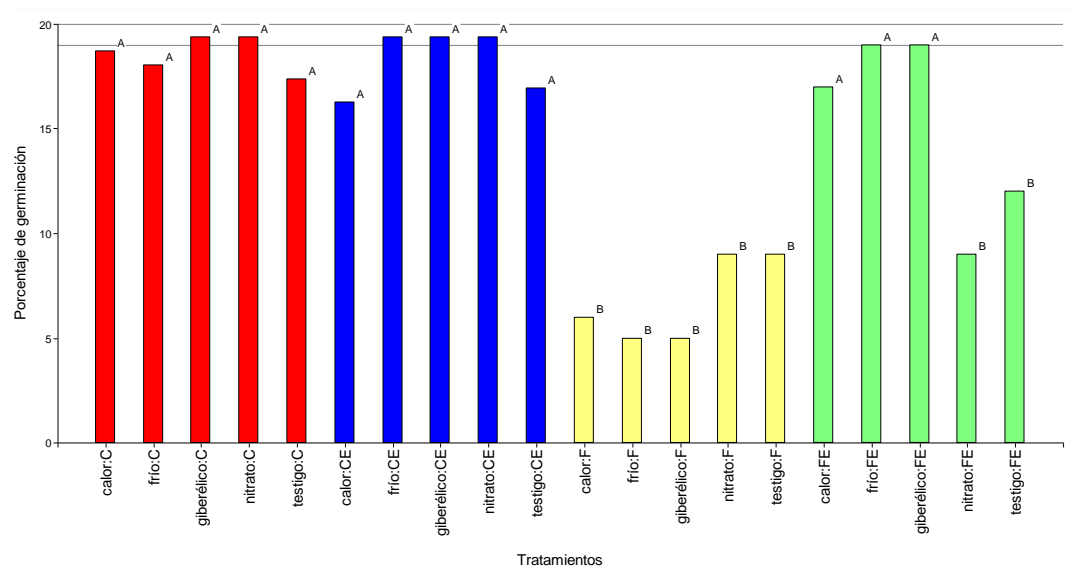


Fig. 4.14 Grupos de germinación formados al día 28 por distintos tipos de materiales de *Cenchrus ciliaris* 'Biloela' con tres meses de almacenamiento. **C**: cariósides (rojo); **CE**: cariósides escarificadas (azul); **F**: fascículos (amarillo); **FE**: fascículos escarificados (verde) y la aplicación en ellos de tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La Figura 4.15 muestra los perfiles promedios de cada uno de los materiales. Tanto las cariósides intactas como escarificadas lograron valores de germinación similares a la viabilidad ajustada por tetrazolio. Los fascículos escarificados se aproximaron al nivel de viabilidad de los antes mencionados, quedando un 4 % por debajo de ellos a los 28 días de la siembra. Mientras que fascículos intactos, aunque lograron valores de germinación superiores respecto al análisis previo (sin almacenamiento), permanecieron distantes de la viabilidad de referencia.

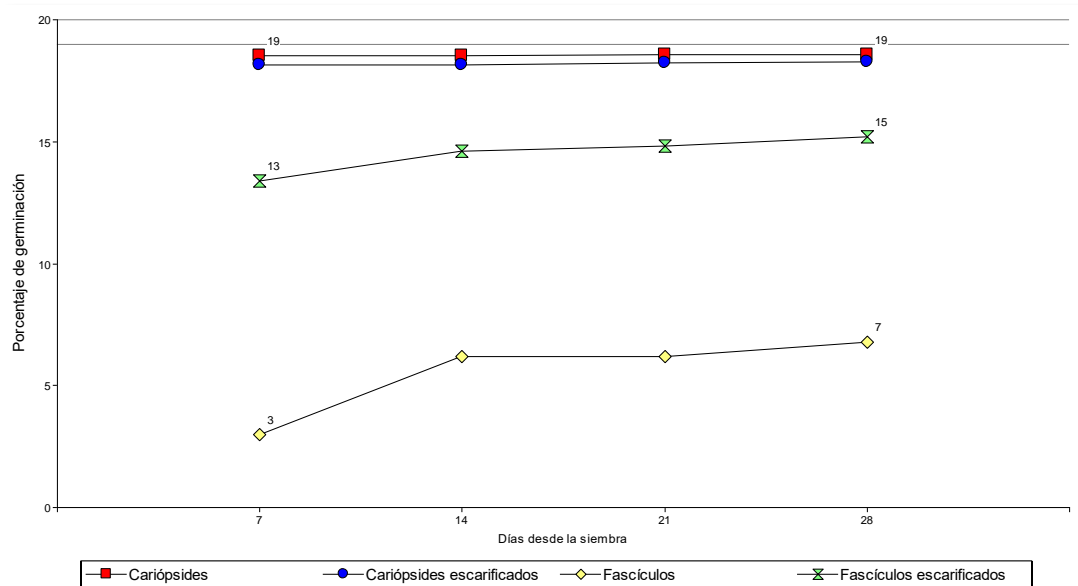


Fig. 4.15 Curvas de germinación promedio para materiales de *Cenchrus ciliaris* 'Biloela' con tres meses de almacenamiento sometidos a diferentes tratamientos pregerminativos.

Una vez finalizados los estudios con 3 meses de almacenamiento, la comparación entre cultivares demostró la presencia de interacción ($p=0,0098$) entre los factores cultivar, material y tratamiento. Durante estos ensayos, la utilización de cariópsides con y sin escarificación tuvo el mismo comportamiento germinativo siendo estos independientes del cultivar y del pretratamiento germinativo. (Figura 4.16).

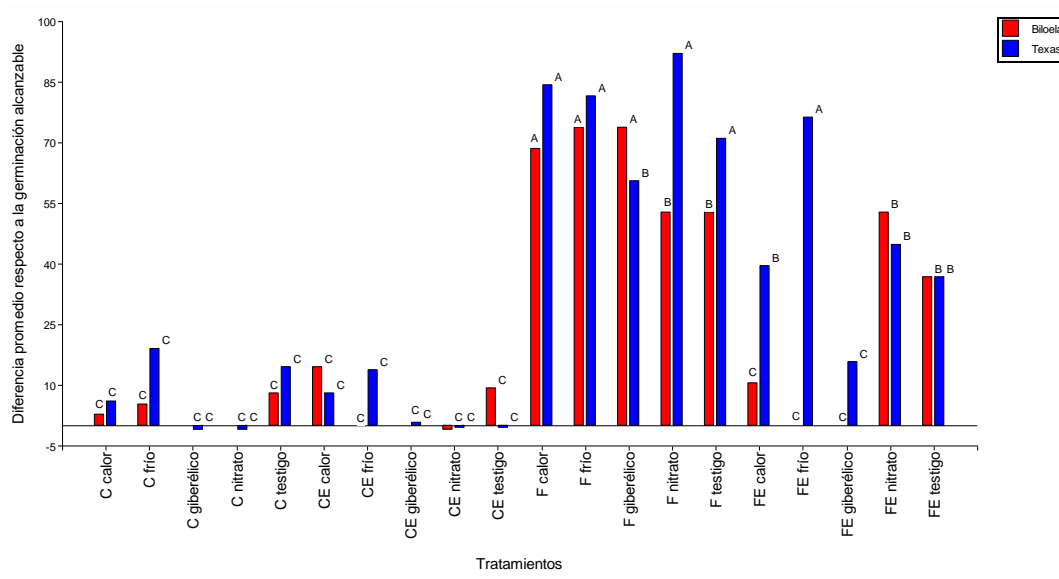


Fig. 4.16 Diferencia promedio respecto a la germinación alcanzable de distintos tratamientos germinativos aplicados a semillas de *Cenchrus ciliaris* 'Texas' y 'Biloela'. 3 meses de almacenamiento.

Respecto a los pretratamientos utilizados en las semillas se resaltó una mejoría en la germinación durante los primeros tres meses de almacenamiento mediante el empleo de AG₃. Del mismo modo, Alvarado *et al.* (2000) observó en semillas de *Solanum tuberosum* L. que el ácido giberélico actúa en la germinación por la inducción de las hidrolasas, enzimas que ablandan el tejido endospermático y facilitan la germinación (protrusión radicular).

***Cenchrus ciliaris* ‘Texas’ con 6 meses de almacenamiento**

Los ensayos correspondientes al tercer momento de evaluación presentaron similitudes respecto al segundo momento (Figura 4.17).

- La germinación de fascículos sin escarificación aumentó respecto al momento previo, aunque el porcentaje de germinación no superó el mínimo comercial.
- El desempeño de fascículos escarificados estuvo dividido, los de mejor performance fueron testigo, KNO₃ y AG₃ con germinación similar a los cariósides, mientras que los tratados con frío y calor tuvieron valores equivalentes a los fascículos intactos.
- El porcentaje de germinación logrado en cariósides con y sin escarificación, alcanzó, a partir del primer conteo, valores similares a la viabilidad ajustada.

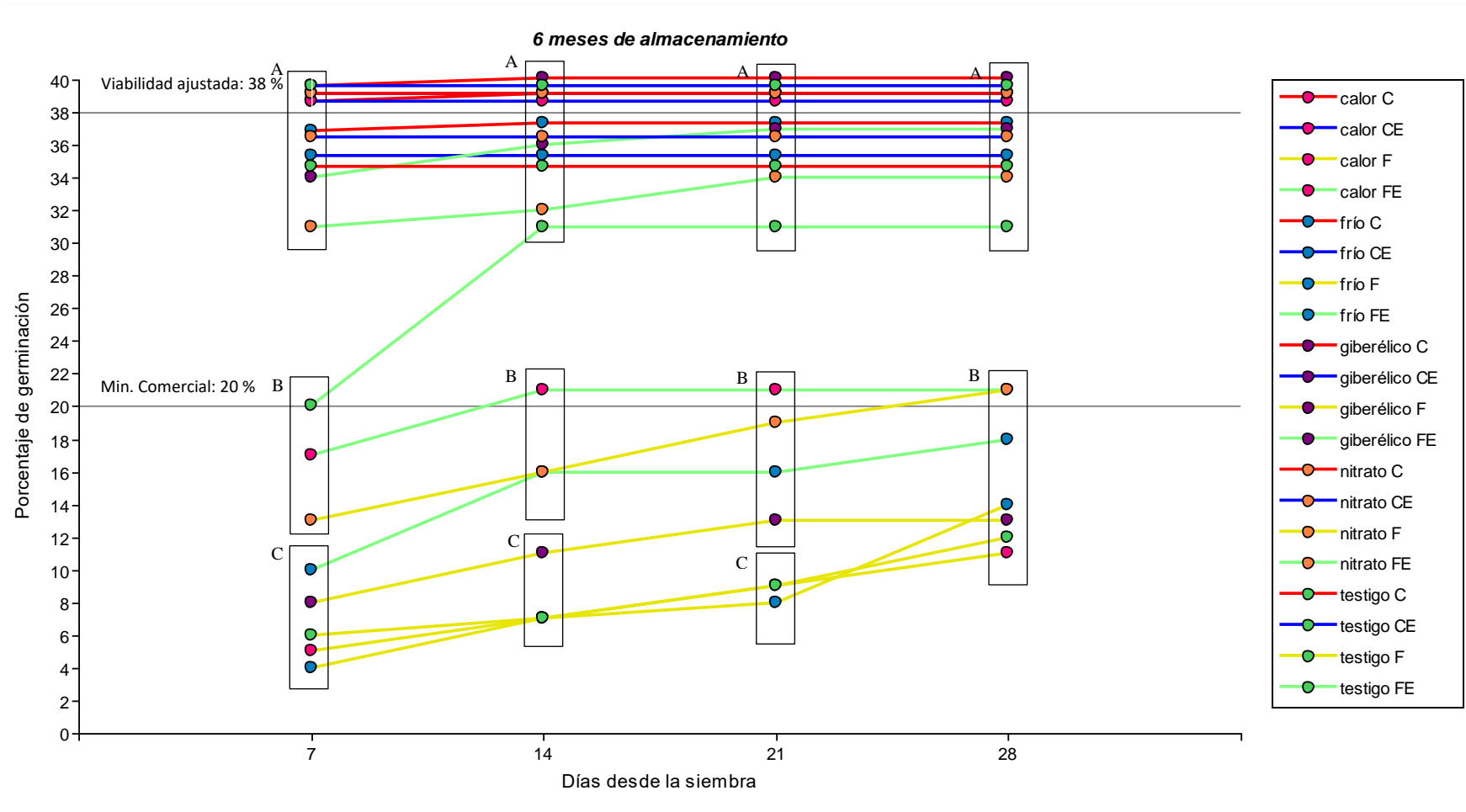


Fig. 4.17 Porcentaje de germinación en *Cenchrus ciliaris* 'Texas' con seis meses de almacenamiento para las combinaciones de materiales y tratamientos utilizados. Líneas de colores muestran materiales. **C**: cariósides (rojo); **CE**: cariósides escarificadas (azul); **F**: fascículos (amarillo); **FE**: fascículos escarificados (verde) y con círculos los tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). En cada día de evaluación letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el día 28 el grupo A, de germinación entre 31 y 40 % estuvo integrado por carióspsides con y sin escarificar en todos los tratamientos aplicados y por fascículos escarificados en los tratamientos testigo, KNO₃ y AG₃. El segundo grupo se formó con fascículos en todos los tratamientos y fascículos escarificados en los tratamientos calor y frío, con porcentajes entre 11 y 21 % (Figura 4.18).

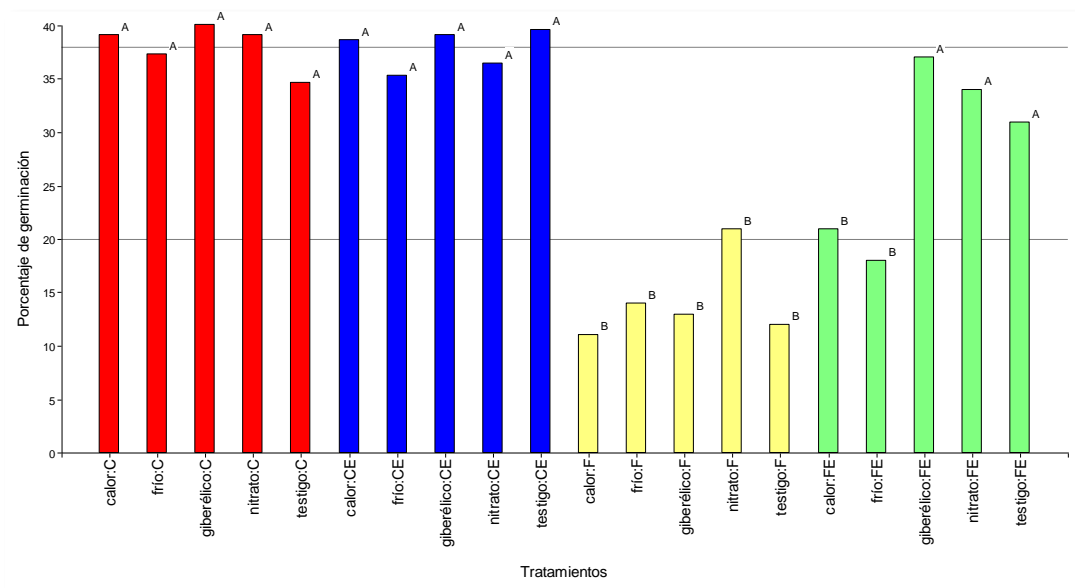


Fig. 4.18 Grupos de germinación formados al día 28 por distintos tipos de materiales de *Cenchrus ciliaris* 'Texas' con seis meses de almacenamiento. **C**: carióspsides (rojo); **CE**: carióspsides escarificadas (azul); **F**: fascículos (amarillo); **FE**: fascículos escarificadas (verde) y la aplicación en ellos de tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La Figura 4.19 muestra un comportamiento similar de carióspsides y carióspsides escarificadas respecto a los porcentajes de germinación alcanzados en el ensayo con tres meses de almacenamiento. Por otra parte, el porcentaje de germinación de los fascículos escarificadas y los fascículos intactos elevaron en un 6 % respecto al momento de análisis previo (28 y 14 % respectivamente), pero sin alcanzar en el caso de los fascículos intactos, el valor mínimo de comercialización (20 %).

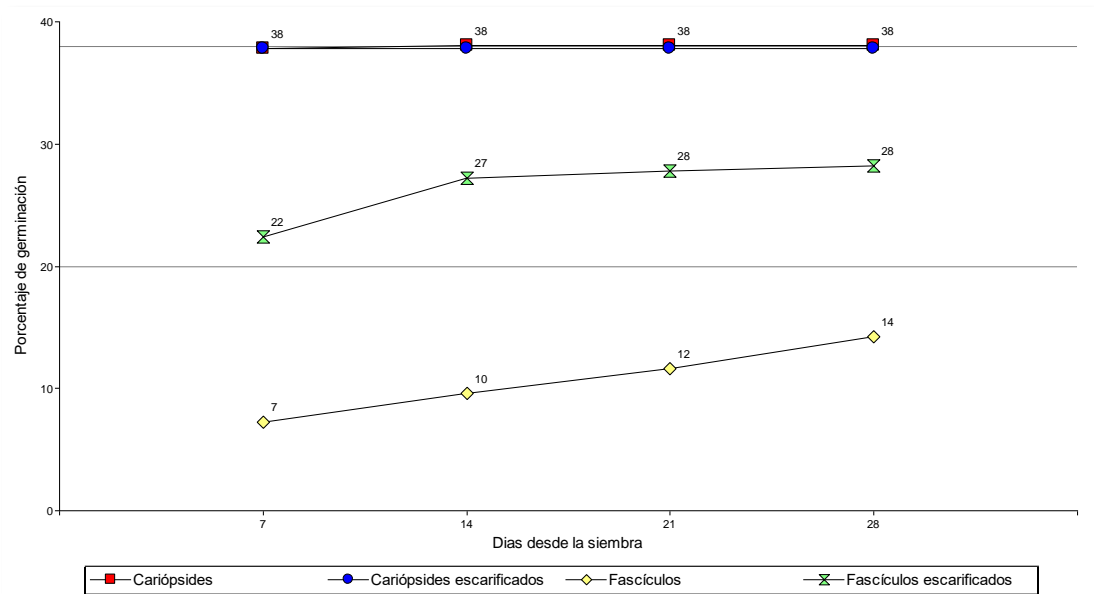


Fig. 4.19 Curvas de germinación promedio para materiales de *Cenchrus ciliaris* 'Texas' con seis meses de almacenamiento sometidos a diferentes tratamientos pregerminativos.

***Cenchrus ciliaris* 'Biloela' con 6 meses de almacenamiento**

Durante el tercer momento de evaluación la germinación tuvo leves diferencias respecto al momento previo de análisis. La Figura 4.20 muestra la evolución de los materiales y tratamientos aplicados en ellos, donde se puede observar que:

- La germinación de los fascículos sin escarificación fue creciente, no alcanzando en el período ensayado resultados acordes a la viabilidad ajustada.
- Los fascículos escarificados tuvieron una germinación intermedia, algunos tratamientos lograron germinar de forma similar a las cariópsides con y sin escarificación.
- Cariópsides con y sin escarificación resultaron ser los de mayor germinación, alcanzando en 7 días la viabilidad ajustada por tetrazolio.

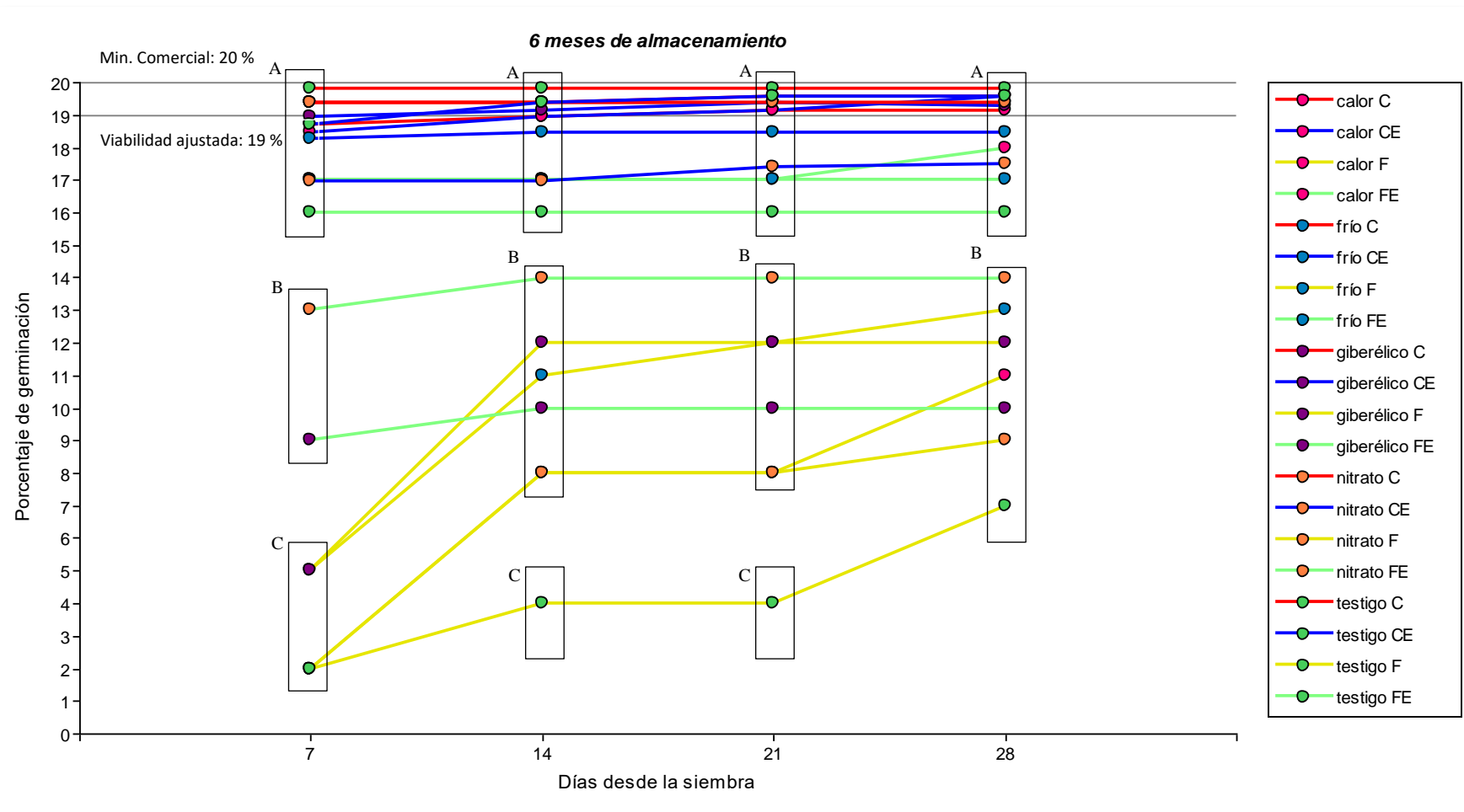


Fig. 4.20 Porcentaje de germinación en *Cenchrus ciliaris* 'Biloela' con seis meses de almacenamiento para las combinaciones de materiales y tratamientos utilizados. Líneas de colores muestran materiales. **C**: carióspsides (rojo); **CE**: carióspsides escarificadas (azul); **F**: fascículos (amarillo); **FE**: fascículos escarificados (verde) y con círculos los tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). En cada día de evaluación letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

En el día 28 se distinguieron 2 grupos de germinación. El primero integrado por carióspsides con y sin escarificación en todos los tratamientos, además de fascículos escarificados en los tratamientos testigo, frío y calor. El grupo B quedó conformado por fascículos en todos los tratamientos y fascículos escarificados en los tratamientos KNO_3 y AG_3 , expresando una germinación de entre 7 y 14 % (Figura 4.21).

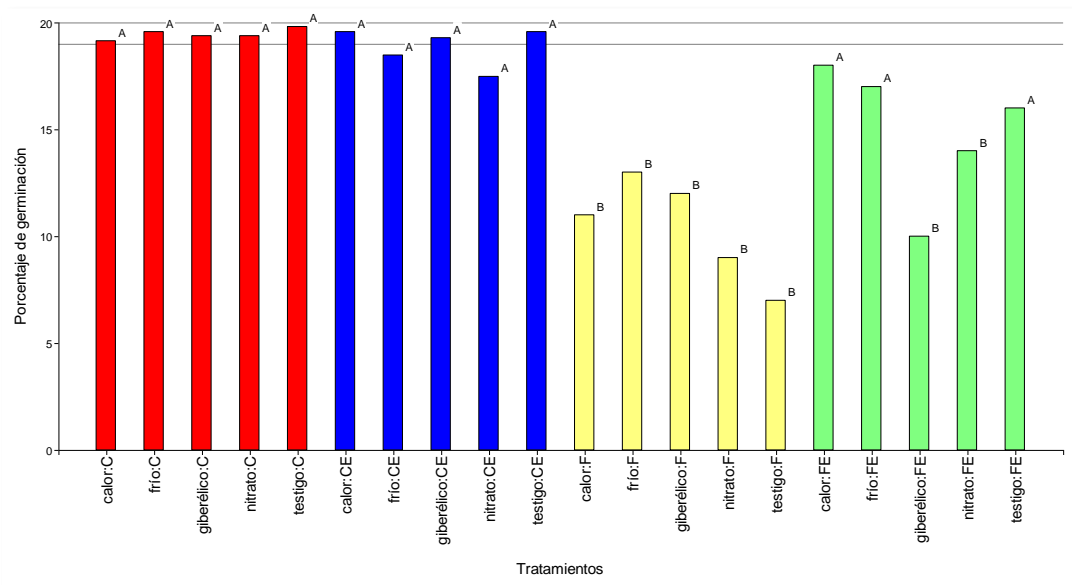


Fig. 4.21 Grupos de germinación formados al día 28 por distintos tipos de materiales de *Cenchrus ciliaris* 'Biloela' con seis meses de almacenamiento. **C**: carióspsides (rojo); **CE**: carióspsides escarificadas (azul); **F**: fascículos (amarillo); **FE**: fascículos escarificados (verde) y la aplicación en ellos de tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Las curvas de germinación promedio de cada material, correspondientes a los 6 meses de almacenamiento (Figura 4.22) tuvieron resultados similares de germinación para los materiales carióspsides, carióspsides escarificadas y fascículos escarificados respecto a los 3 meses de almacenamiento. Por su parte, los fascículos intactos mejoraron en un 3 % su germinación respecto al momento de análisis previo.

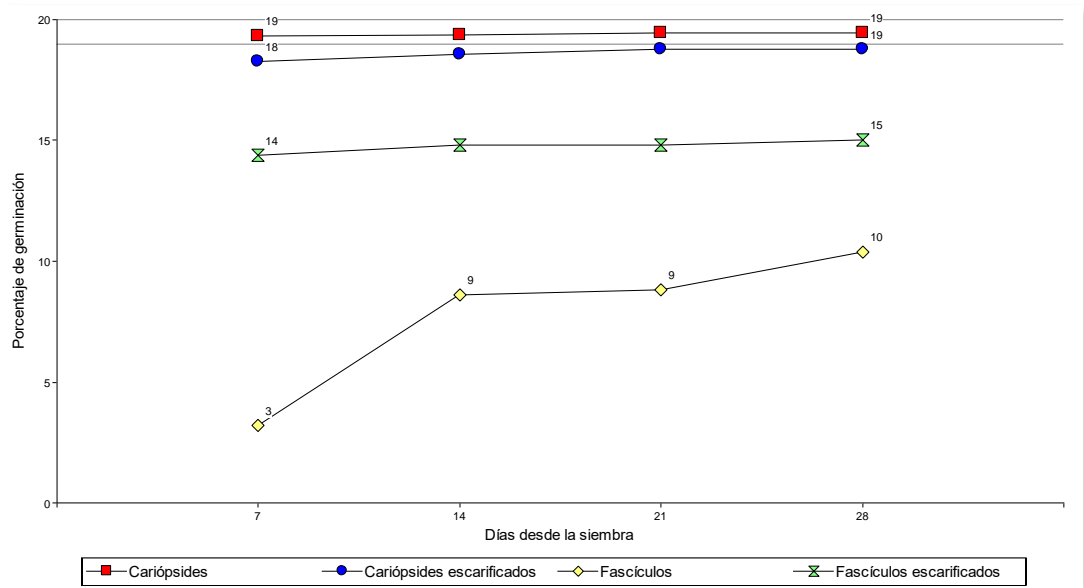


Fig. 4.22 Curvas de germinación promedio para materiales de *Cenchrus ciliaris* ‘Biloela’ con seis meses de almacenamiento sometidos a diferentes tratamientos pregerminativos.

La Figura 4.23 expresa el desempeño de la germinación de los dos cultivares luego de un almacenamiento de 6 meses. El análisis de los resultados mostró interacción triple entre los factores cultivar, material y tratamiento ($p=0,0105$). Los materiales cariópsides con y sin escarificación fueron los de comportamiento más estable durante los ensayos.

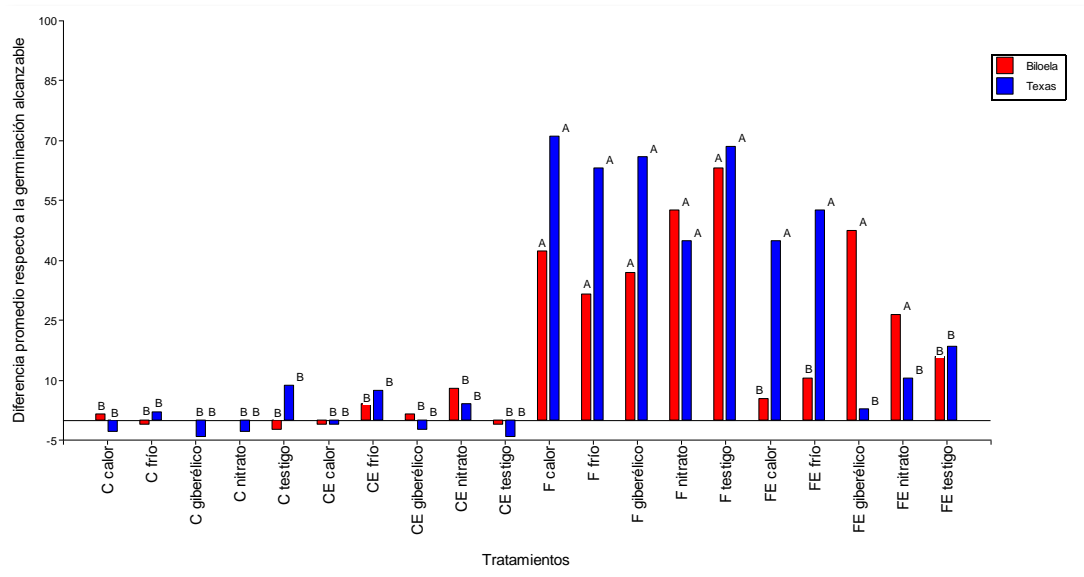


Fig. 4.23 Diferencia promedio respecto a la germinación alcanzable de distintos tratamientos germinativos aplicados a semillas de *Cenchrus ciliaris* ‘Texas’ y ‘Biloela’. 6 meses de almacenamiento.

***Cenchrus ciliaris* 'Texas' con 9 meses de almacenamiento**

La Figura 4.24 muestra el desempeño de los distintos tratamientos, aquí se pudo observar que:

- Con la misma tendencia de lo ocurrido a los 6 meses de almacenamiento, los valores de germinación de fascículos escarificados fue mayor a los fascículos sin escarificar. Los fascículos intactos permanecieron con germinación menor al mínimo requerido por el comercio.
- La germinación de cariósides con y sin escarificación fue similar a la viabilidad ajustada por tetrazolio y superó de manera considerable el mínimo de germinación requerido para la comercialización.

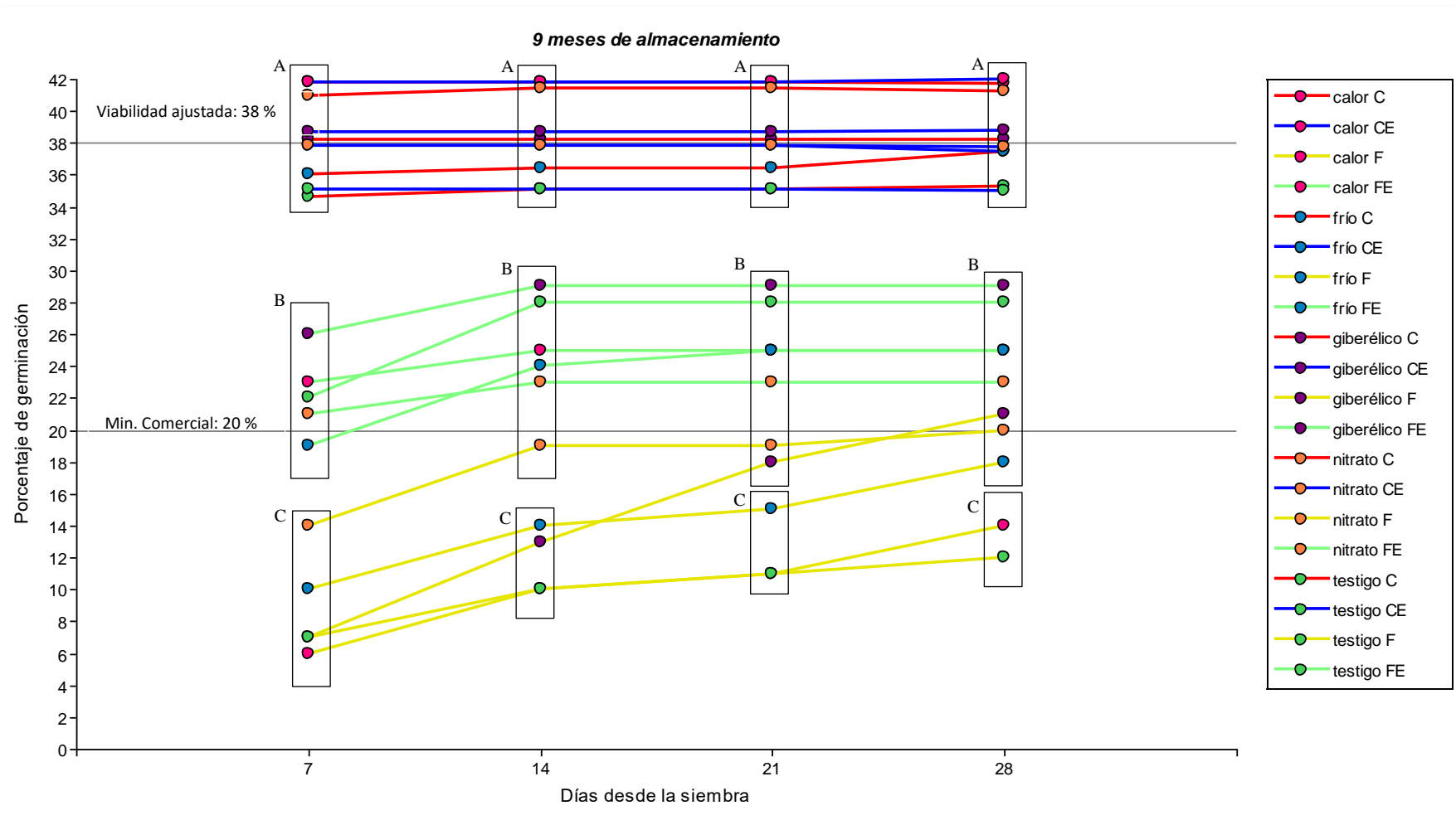


Fig. 4.24 Porcentaje de germinación en *Cenchrus ciliaris* 'Texas' con nueve meses de almacenamiento para las combinaciones de materiales y tratamientos utilizados. Líneas de colores muestran materiales. **C**: cariósides (rojo); **CE**: cariósides escarificadas (azul); **F**: fascículos (amarillo); **FE**: fascículos escarificados (verde) y con círculos los tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). En cada día de evaluación letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Hacia el día 28, la finalización de los ensayos expuso que los materiales de mejor desempeño fueron cariósides y cariósides escarificadas con todos sus tratamientos, conformando el grupo A. El grupo B (18-29 % de germinación), aún alejados del valor de viabilidad, correspondió a fascículos escarificados con todos los tratamientos y fascículos intactos con los tratamientos de frío, KNO₃ y AG₃. Por último, el grupo C con 12 y 14 % de germinación, se formó con fascículos intactos en los tratamientos testigo y calor respectivamente. La Figura 4.25 muestra los comportamientos para cada tipo de material.

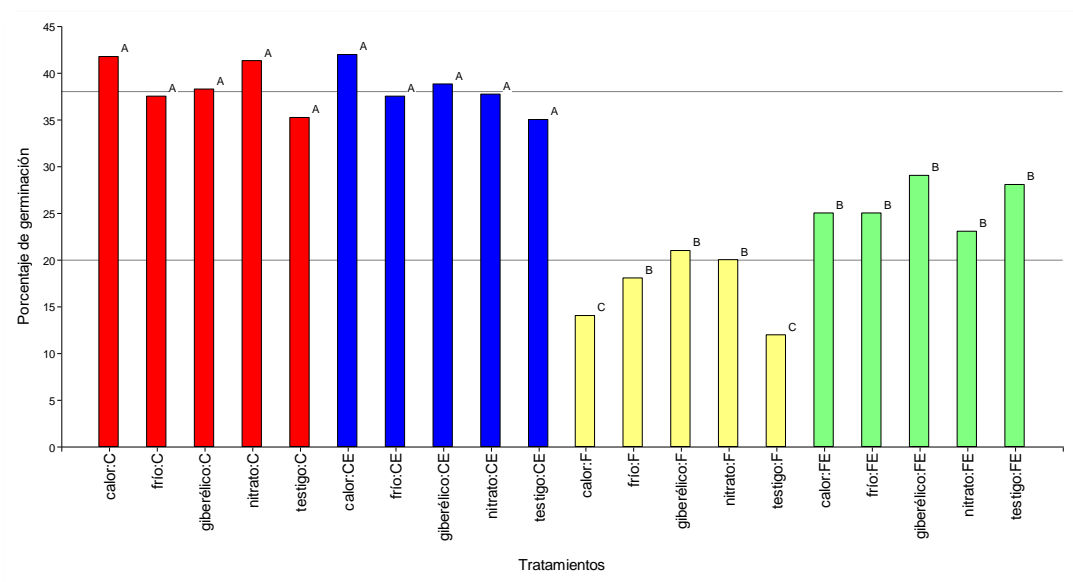


Fig. 4.25 Grupos de germinación formados al día 28 por distintos tipos de materiales de *Cenchrus ciliaris* 'Texas' con nueve meses de almacenamiento. **C**: cariósides (rojo); **CE**: cariósides escarificadas (azul); **F**: fascículos (amarillo); **FE**: fascículos escarificados (verde) y la aplicación en ellos de tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La figura 4.26 presenta desempeños de los distintos materiales transcurridos 9 meses de almacenamiento. Las cariósides y cariósides escarificadas lograron a partir del día 7 valores similares a la viabilidad ajustada. Por su parte, los fascículos escarificados, luego de estabilizarse hacia el día 14 alcanzaron un 26 % de plántulas normales. Los fascículos intactos expresaron, en promedio, la menor germinación.

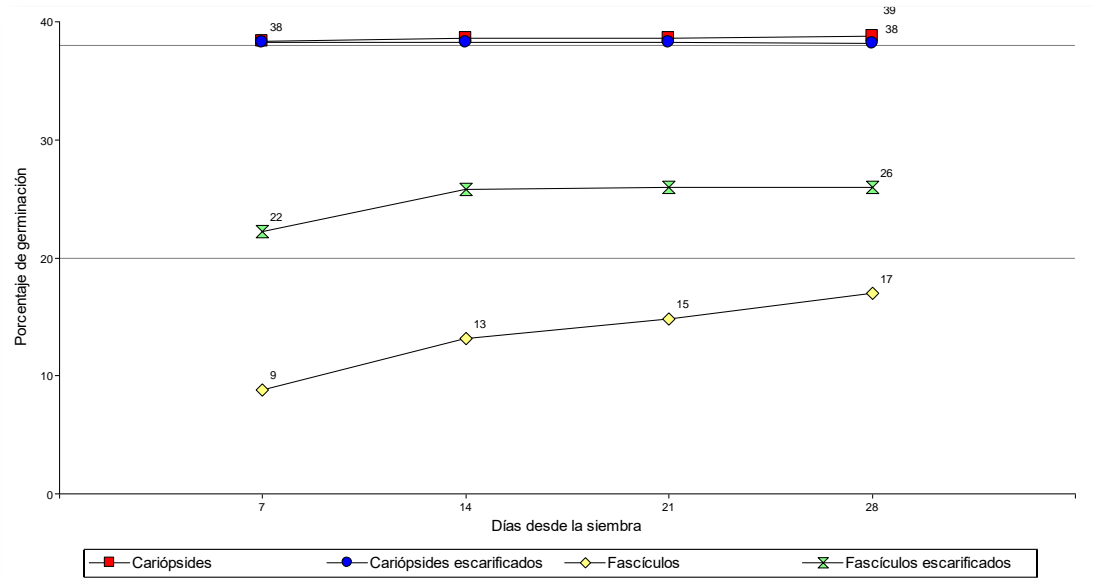


Fig. 4.26 Curvas de germinación promedio para materiales de *Cenchrus ciliaris* 'Texas' con nueve meses de almacenamiento sometidos a diferentes tratamientos pregerminativos.

***Cenchrus ciliaris* 'Biloela' con 9 meses de almacenamiento**

En la evaluación correspondiente al cuarto momento de evaluación, se diferenciaron 2 grupos de germinación (Figura 4.27).

- A diferencia de los ensayos anteriores, los fascículos sin escarificar tuvieron valores de germinación superiores a los fascículos escarificados, aunque se separaron en dos grupos estadísticamente diferentes.
- Los mejores resultados se lograron con cariópsides con y sin escarificar en todos los tratamientos aplicados.

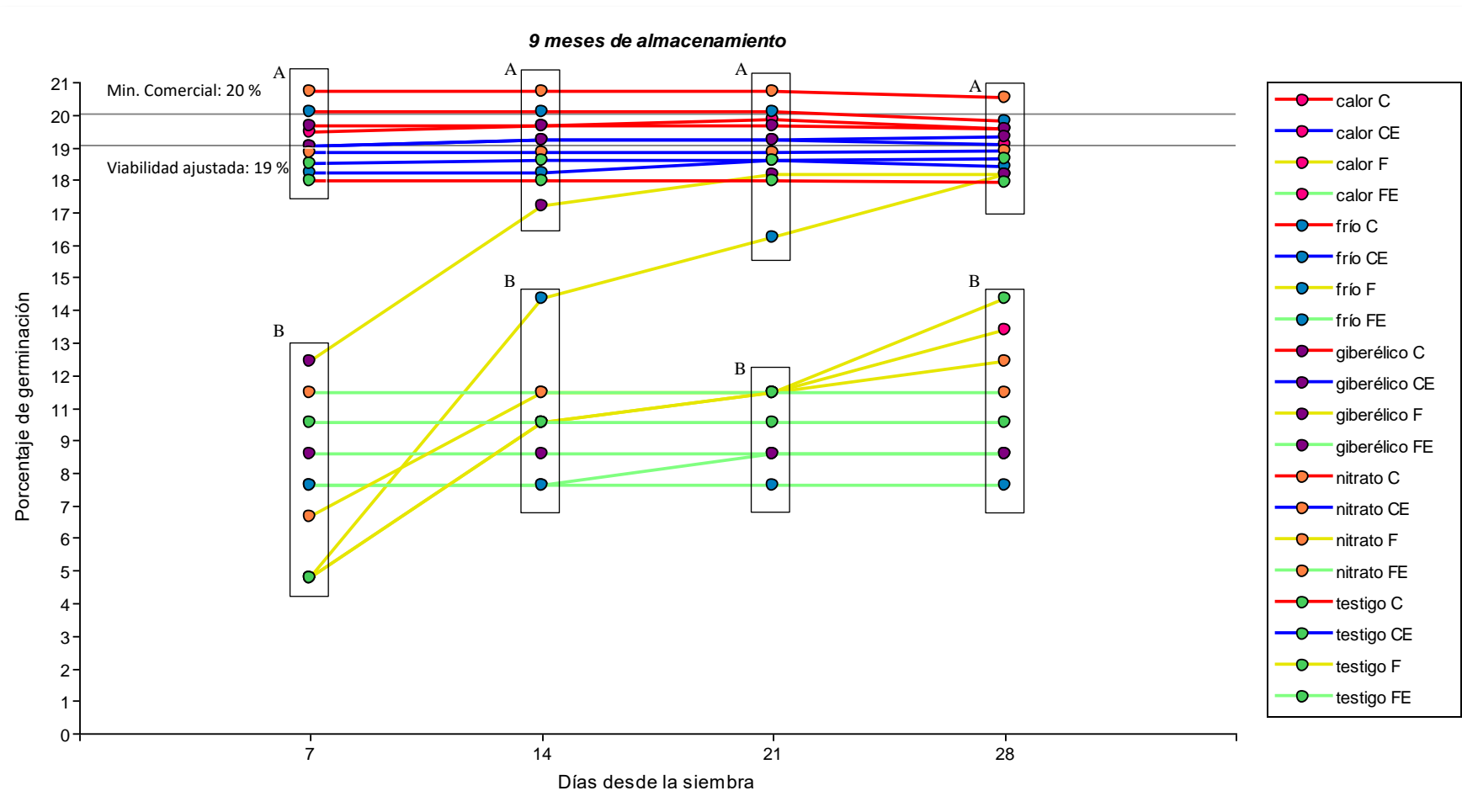


Fig. 4.27 Porcentaje de germinación en *Cenchrus ciliaris* 'Biloela' con nueve meses de almacenamiento para las combinaciones de materiales y tratamientos utilizados. Líneas de colores muestran materiales. **C**: carióspsides (rojo); **CE**: carióspsides escarificadas (azul); **F**: fascículos (amarillo); **FE**: fascículos escarificados (verde) y con círculos los tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). En cada día de evaluación letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Al día 28 la evaluación mostró que el desempeño de fascículos intactos con tratamientos frío y giberélico alcanzaron porcentajes similares a carióspsides con y sin escarificación formando el grupo A. Por otra parte, los fascículos escarificados tuvieron germinación más baja, acompañados por el resto de los fascículos sin escarificar (testigo, KNO₃ y calor) (Figura 4.28).

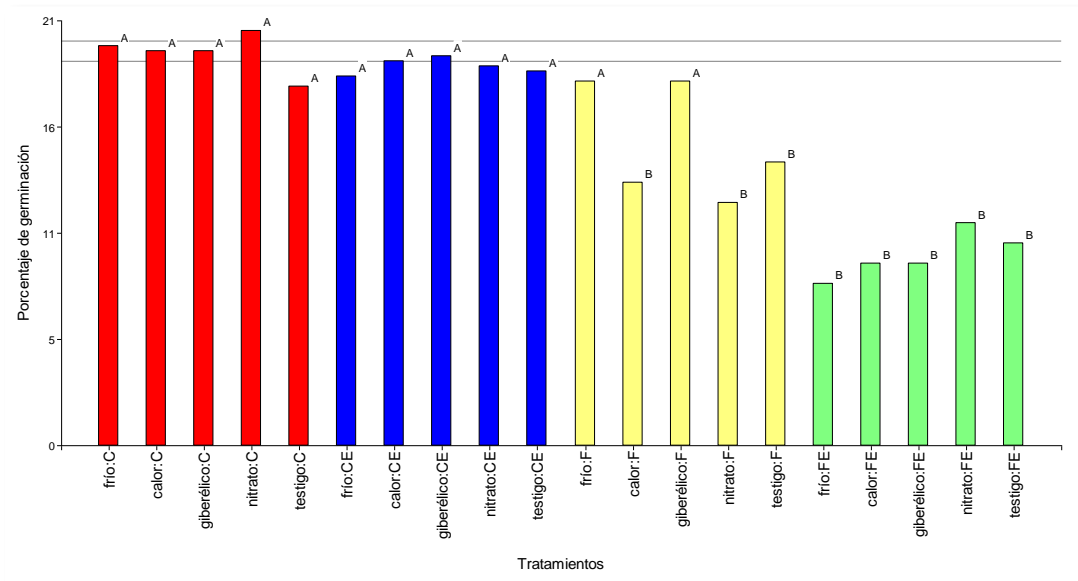


Fig. 4.28 Grupos de germinación formados al día 28 por distintos tipos de materiales de *Cenchrus ciliaris* 'Biloela' con nueve meses de almacenamiento. **C**: carióspsides (rojo); **CE**: carióspsides escarificadas (azul); **F**: fascículos (amarillo); **FE**: fascículos escarificados (verde) y la aplicación en ellos de tratamientos germinativos (testigo; frío; calor; nitrato de potasio y ácido giberélico). Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

La germinación de los materiales a los 9 meses de almacenamiento fue distinta respecto a los 6 meses de almacenamiento, dado que los fascículos intactos superaron a los fascículos escarificados. Carióspsides con y sin escarificación mantuvieron un desempeño similar a los dos momentos de análisis previos (Figura 4.29).

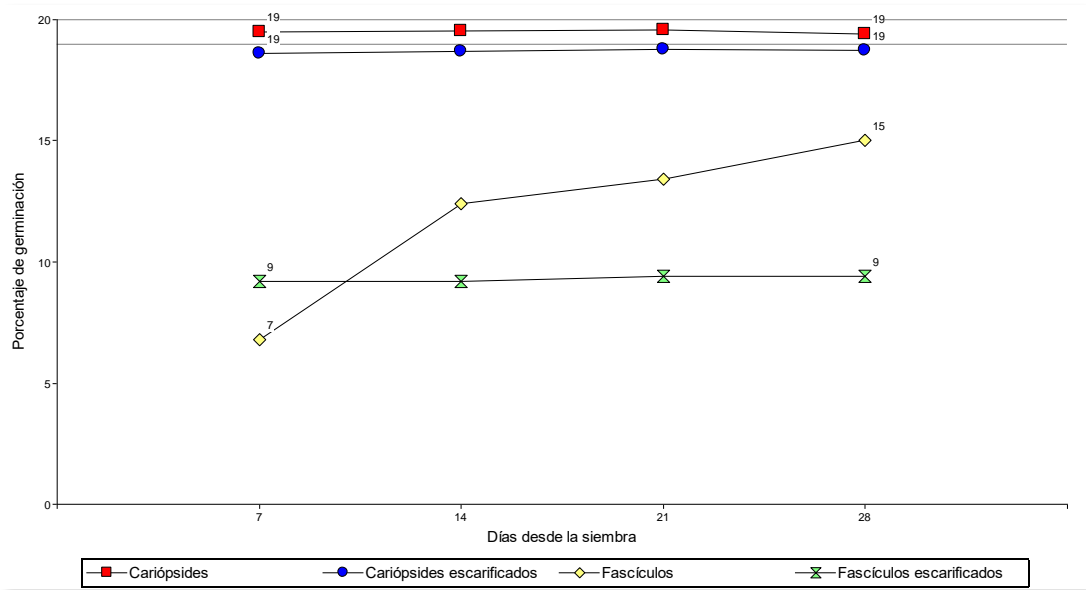


Fig. 4.29 Curvas de germinación promedio para materiales de *Cenchrus ciliaris* ‘Biloela’ con nueve meses de almacenamiento sometidos a diferentes tratamientos pregerminativos.

En el cuarto momento de evaluación, se produjeron nuevamente diferencias en el tipo de material utilizado, distinguiéndose cariópsides y cariópsides escarificadas de los demás. Durante los ensayos de este momento de evaluación, no hubo efectos marcados entre los tratamientos germinativos. La interacción dada en análisis previos (tratamiento, material y genotipo) aquí no se observó, siendo de importancia la interacción de material y genotipo ($p < 0,0001$). (Figura 4.30).

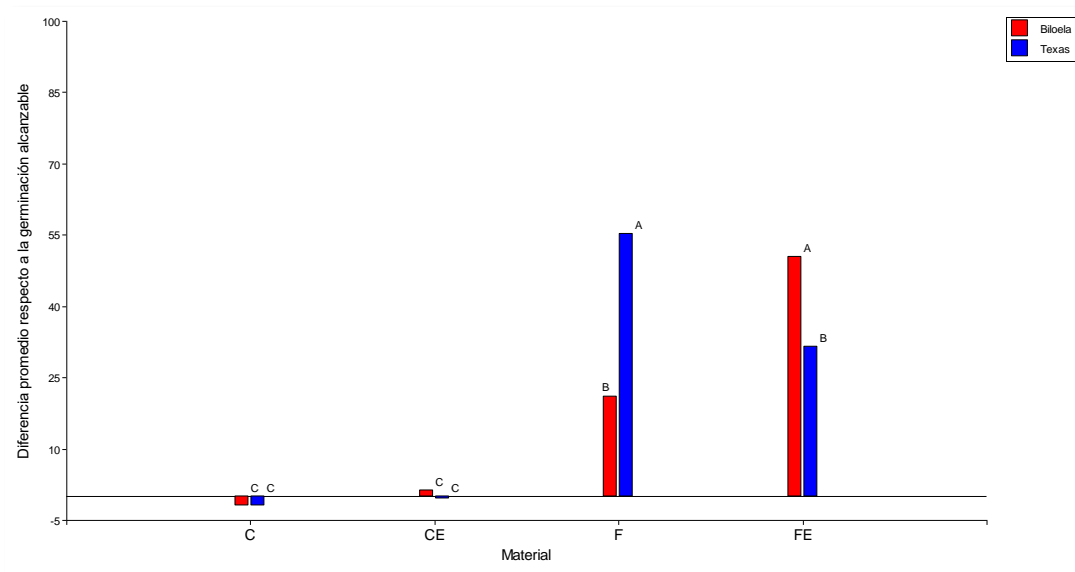


Fig. 4.30 Diferencia promedio respecto a la germinación alcanzable de los distintos materiales utilizados como semillas en *Cenchrus ciliaris* 'Texas' y 'Biloela'. 9 meses de almacenamiento.

En los ensayos realizados a los 3, 6 y 9 meses post cosecha los porcentajes de germinación de cariósides y de cariósides escarificadas de *Cenchrus ciliaris* 'Texas' y 'Biloela' no fueron estadísticamente diferentes entre ellos, pero sí respecto de los materiales fascículos y fascículos escarificados. En dichas evaluaciones, la germinación de cariósides y de cariósides escarificadas alcanzó en 7 días (primer conteo) valores cercanos o iguales a la viabilidad ajustada para cada lote, contemplando la tolerancia del 5 % respecto a los valores de viabilidad señalada por Franca Neto *et al.* (1998). Luego y hasta cumplirse los 28 días, no tuvieron una mejora significativa a raíz de la no existencia de semillas vivas que pudieran germinar. En cambio, los materiales correspondientes a fascículos y fascículos escarificados mostraron un leve progreso de la germinación durante el período ensayado, siendo la germinación de los fascículos intactos menor a la germinación de los fascículos escarificados en la gran mayoría de los casos. Sólo en la evaluación a los 9 meses post cosecha en el cultivar Biloela, se invirtió el porcentaje de germinación y los fascículos con pretratamientos de frío y AG₃ alcanzaron un valor sin diferencias con la viabilidad ajustada del lote (19 %).

En *Cenchrus ciliaris* se comprobó la existencia de dos barreras que dificultan o impiden la germinación, una externa y otra interna. La más superficial constituida por

el conjunto de estructuras que rodean al cariósido (involucro, glumas, lemmas y páleas) y una interna propia del cariósido. Tal como lo expresaron Bewley y Black (1994) en semillas con dormición, para que el proceso de germinación ocurra, el impedimento que la condiciona debe ser removido o superado. De esta manera, la germinación de cariósidos fue mayor a la obtenida en fascículos, consecuencia de la eliminación de las barreras que forman las cubiertas protectoras que dichas semillas poseen. Del mismo modo, Andersen (1953), Watson (1955), Loch (1993), Sharif-Zadeh y Alistair Murdoch (2001) y Parihar y Pathak (2006) observaron el mismo comportamiento al experimentar con semillas de esta especie.

En el caso de los fascículos escarificados, los cortes realizados en el sitio de inserción de las espiguillas eliminaron parcialmente la dormición, ya sea por seccionar las estructuras propias del involucro y/o escarificar involuntariamente el/los cariósidos contenidos en ellos. Por esta razón, la germinación de los fascículos escarificados exhibió durante los distintos momentos de evaluación, valores superiores a los de fascículos intactos y alcanzando, en algunos casos, una germinación sin diferencias significativas respecto a cariósidos intactas y a cariósidos escarificadas.

De acuerdo a Bewley y Black (1982), las cubiertas seminales pueden ejercer influencias negativas sobre la germinación por distintos mecanismos. Es probable que en los análisis realizados la mayor germinación de los fascículos escarificados respecto a los fascículos sin escarificar sea consecuencia de la apertura de vías de ingreso de agua, el intercambio gaseoso e inclusive el ablandamiento de las estructuras que ocasionan restricciones mecánicas. De esta forma, coincidiendo con Loch (1993), la velocidad de germinación de cariósidos está condicionada por el ingreso de agua en ausencia de las cubiertas de protección.

La presencia de inhibidores en las cubiertas, tal como expresaron Parihar y Kanodia (1984) no se puede descartar debido a que no se realizó un estudio químico para corroborarlo. Sin embargo, la buena germinación de los fascículos escarificados, los cuales mantienen setas, glumas, lemmas y páleas en su lugar original, sin eliminarlas, podría ser un indicio de su ausencia.

Por otra parte, al comparar la germinación de cariósides intactas con cariósides escarificadas en semillas sin almacenamiento, se demostró que existe un obstáculo para la germinación situado en el pericarpio de las cariósides. Tal comportamiento fue también observado por autores que escarificaron cariósides de 31 especies de pastos los cuales lograron una mejora importante en la germinación (Simpson, 1990). En concordancia con Murdoch y Ellis (2000) existe una clara asociación de los mecanismos de dormición a la cariósida. Al realizar la evaluación de la germinación en materiales con diferente tiempo de almacenamiento se determinó que dicho mecanismo de dormición, situado en el pericarpio y propio de cariósides, pierde efecto luego de un período de almacenaje de al menos 3 meses. Coincidiendo con Simpson (1990), quién indicó la post maduración como un período clave para la eliminación de la dormición relacionada a las cubiertas seminales. Este es el motivo principal por el cual la germinación de cariósides intactas y de cariósides escarificadas no presentó diferencias significativas en las evaluaciones de los 3, 6 y 9 meses.

En el caso de los fascículos intactos, el impedimento de la germinación se mantuvo inclusive después de ser almacenado durante 9 meses. La germinación observada en ellos fue gradual y creciente a través del tiempo; sin embargo dichos materiales nunca lograron valores de germinación satisfactorios, o sea acordes a la viabilidad ajustada para el lote en ninguno de los cultivares probados.

El aumento paulatino de los porcentajes de germinación de los fascículos y fascículos escarificados con el tiempo de almacenamiento, demuestra que luego de 9 meses post cosecha ciertos componentes que afectan la dormición siguen actuando, bloqueando la germinación. Como consecuencia, la capacidad germinativa del lote no es expresada en su totalidad. En cariósides extraídas de fascículos el bloqueo de la germinación continuó sólo en aquellas semillas con menos de tres meses de almacenaje en seco, el cual fue removido por medio de la escarificación. Este comportamiento de los fascículos, se relaciona con lo expresado por Parihar y Pathak (2006) quienes observaron que en distintos pastos tropicales perennes el período de dormición varió entre 3 y 9 meses, y en *Cenchrus ciliaris* específicamente obtuvieron valores de 42–92 % pero en cariósides que provenían de un almacenaje de fascículos de 9 meses y que posteriormente fueron desglumados.

No obstante, con cada tiempo de almacenaje y en los cultivares utilizados, el factor determinante para la germinación fue el tipo de semilla utilizada (fascículo o cariósido) y la preparación que en ellas se efectuó (escarificado). Esta respuesta de la escarificación mecánica de los cariósidos guarda similitudes con los resultados de Bhattari *et al.* (2008) quienes mediante la escarificación química lograron mejorar la germinación de cariósidos de *Cenchrus ciliaris*.

El estímulo del pretratamiento con frío sobre la germinación observado por Andersen (1953) y del pretratamiento con calor indicado por Brown (1952), Andersen (1953) y Butler (1985) no fueron consistentes en este trabajo. Asimismo, y de acuerdo con Butler (1985), no se encontraron respuestas satisfactorias al humedecer el sustrato de germinación con nitrato de potasio.

En análisis realizados en laboratorio, cuanto menor es la diferencia entre el valor estimado de viabilidad por tetrazolio y el porcentaje de germinación logrado, tanto mejores serán las técnicas para cuantificar dichos parámetros de calidad en semillas. Coincidiendo con Wood *et al.* (2005), tanto los protocolos de viabilidad como de germinación deben ser revisados para asegurar una relación 1:1 entre dichas mediciones de calidad. Esto último, para el caso de *Cenchrus ciliaris* indica, en primer término, qué alternativa de preparación (material - semilla) es la más adecuada para superar la dormición y segundo, el relevante valor de estimación de semillas viables que posee la técnica de viabilidad por tetrazolio.

Según lo expresado por Baskin y Baskin (2014) que citan a *Cenchrus ciliaris* como una especie que posee el tipo de dormición fisiológica, se observó una clara influencia de las cubiertas seminales en la expresión de la dormición, además de una respuesta a la aplicación de AG₃. Probablemente, la variación de los resultados de distintos autores respecto a la dificultad para la germinación estén relacionados a dos cuestiones básicas: no todas las unidades de dispersión (fascículos) se encuentran llenos, o sea con cariósidos en su interior, y que además, las cubiertas producen fluctuaciones en la expresión de la germinación.

De acuerdo a lo estudiado por Hacker y Ratcliff (1989), las características de las semillas relacionadas a la procedencia de los materiales y al clima tienen una influencia marcada en los atributos de dormición, por lo que se indica la técnica de

determinación del porcentaje de fascículos llenos y la utilización de cariósides para la germinación como herramientas fundamentales para una correcta determinación de la calidad en *Cenchrus ciliaris*.

Además, debido a que la temperatura de maduración, la fertilidad y contenido hídrico de los suelos afectan la dormición en cariósides (Sharif-Zadeh y Alistair Mordoch, 2001) estudios posteriores de la técnica de germinación aplicada sobre materiales de distintos orígenes y años de cosecha, deben ser realizados.

CONCLUSIONES

- Los tratamientos recomendados por las reglas Internacionales ISTA (2012) para romper dormición en *Cenchrus ciliaris* no son lo suficientemente efectivos para eliminar dormición en semillas recién cosechadas de ‘Texas’ y ‘Biloela’.
- La utilización de cariósides escarificadas en el momento inmediato a la post cosecha permitió obtener valores de germinación cercanos a la viabilidad ajustada del lote de semillas.
- Con un almacenaje de 3 meses la utilización de cariósides con y sin escarificación produjo los mejores resultados, por lo tanto no sería necesaria la escarificación en cariósides.
- En *Cenchrus ciliaris* existen dos impedimentos que dificultan la germinación, uno externo formado por involucro, brácteas, glumas, lemma y páleas y otro interno, propio del pericarpio de las cariósides.
- Para expresar los resultados de germinación en un lote de semillas compuesto por fascículos, se recomienda realizar el ensayo con cariósides, determinar el porcentaje de fascículos llenos y utilizarlo como factor de corrección.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarado, V.; H. Hiroyaki and K.J. Bradford, 2000. Expression of endo- β -mannanase and SNF-related protein kinase genes in true potato seeds in relation to dormancy, gibberellin and abscisic acid. pp. 347-364.
- Andersen, A. M. 1953. Germination of Buffel Grass *Pennisetum ciliare* (Link.) seed. *Association of official Seed Analyst of North America Newsletter*. 27: 36-37.
- Baskin, J.M. and Baskin, C.C. 1989. Physiology of Dormancy and Germination in Relation to Seed Bank Ecology. *Ecology of Soil Seed Banks*. Academic Press Inc. pp. 53-66.
- Baskin, J.M. and Baskin, C.C. 1998. *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. San Diego. Academic Press. 666pp.
- Baskin, J.M. Baskin C.C. and Li, X. 2000. Taxonomy, ecology, and evolution of physical dormancy in seeds. *Plant Species Biology*. 15: 139-152.
- Baskin J. M. and Baskin C. C. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*. 14: 1-16.
- Baskin, J. M. and Baskin, C. C. 2014. *Seeds Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press. San Diego. 1586 pp.
- Bhattarai, S.P.; J. Fox and J. Gyasi-Agyei Y. 2008. Enhancing buffelgrass seed germination by acid treatment for rapid vegetation establishment on railway batters. *Journal of Arid Environments*. 72: 255-262.
- Bewley J.D. and M. Black. 1982. *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*. Vol.2. Viability, Dormancy and Environmental Control. Berlin Springer- Verlag.
- Bewley J.D. and M. Black. 1994. Dormancy and the control of germination. *Seeds of development and germination*. Ed. Plenum Press. New York and London. pp. 199-271.
- Brown, E. O. 1952. Notes on germination of Buffel Grass. *Association of official Seed Analyst of North America Newsletter*, 26, 17.

- Butler, J. E. 1985. Germination of Buffel Grass (*Cenchrus ciliaris*). *Seed Science and Technology*. 13: 583-591.
- Di Rienzo J.A., Guzmán A.W., Casanoves F. 2002. A Multiple Comparisons Method Based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environment Statistics*, 7(2): 1-14.
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez, Tablada M., Robledo C.W. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Franca Neto, J. B.; Krzyzanowski, F. C.; Costa N. P. da. 1998. El Test de Tetrazolio en semillas de soja. Londrina. Embrapa. Brasil 72 pp.
- Hacker, J.B. 1989. The potential for Buffel Grass renewal from seed in 16-year-old Buffel Grass-siratro pastures in south-east Queensland. *Journal of Applied Ecology*. 26: 213-222.
- Hacker, J.B. and Ratcliff, D. 1989. Seed dormancy and factors controlling dormancy breakdown in Buffel Grass accessions from contrasting provenances. *Journal of Applied Ecology*. 26: 201-212.
- Humphreys, L. R. 1974. Pasture grasses. In *A guide to better pastures for the tropics and sub-tropics*. Wright Stephenson and Co. (Aust.) Pty. Ltd.
- ISTA. 2009. International Seed Testing Association. Handbook on Seedling Evaluation. Third Edition. (Ed.) R. Don. Zürich
- ISTA. 2012. International Seed Testing Association. International Rules for Seed Testing. *Seed Science and Technology* 31, Supplement. Zürich
- Loch, D. S. 1993. Improved handling of chaffy grass seeds; option, opportunities and value. *Tropical Grasslands*. 27: 314-326.
- Murdoch, A.J. and Ellis, R.H. 2000. Dormancy, Viability and Longevity. In, Fenner, M. (ed.), *Seeds: The Ecology of Regeneration and Plant Communities*. 2nd edition, CAB International, Wallingford, Oxon UK, pp 183-214.

- Nikolaeva, G.M. 1977. Factors controlling the seed dormancy pattern. In: Kahan A.A. (ed.) *Physiology and Biochemistry of Seed Dormancy and Germination*, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Holand, pp 50-73. Tomado de Camacho Morfin F. 1994. *Dormición de semillas: Causas y tratamientos*. Ed. Trillas, México. 125p.
- Palma-Rivero, M.P.; Lopez-Herrera, A. y Molina-Moreno., J.C. 2000. Condiciones de almacenamiento y germinación de semillas de *Cenchrus ciliaris* L. y *Andropogon gayanus* Kunth. *Agrociencia*. 34: 42-48.
- Parihar, S.S. and Kanodia K.C. 1984. Seeds germination studies with *Cenchrus sitigerus*. II. Inhibition of seed germination by spikelet leachate and identification of inhibitors. *Plant and Nature* 2: 71-75.
- Parihar, S.S. and Pathak, P.S. 2006. Flowering phenology and seed biology of selected tropical perennial grasses. *Tropical Ecology* 47(1) 81-87.
- Sendulsky, T., Filgueiras, T.S. and Burman, A.G. 1986. Fruits, embryos and seedlings. In *Grass Systematics and Evolution*, ed. T. R. Soderstrom, K. W. Hilu, C. S. Campbell and M. E. Barkworth, Washinston. D. C., Smithsonian Institute, pp. 31-36
- Sharif-Zadeh, F. and Alistar J. Murdoch. 2000. The effect of different maturation conditions on seed dormancy and germination of *Cenchrus ciliaris*. *Seed Science Research*. 10: 447-457.
- Sharif-Zadeh and Murdoch, A.J. 2001. The effects of temperature and moisture on after-ripening of *Cenchrus ciliaris* seeds. *Journal of Arid Environments*. 49: 823-831.
- Simpson, G. M. 1990. *Seed Dormancy in Grasses*. Department of Crop Science and Plant Ecology. University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada. 297 pp.
- Watson, C. E. 1955. Germination studies of Buffel Grass. *Association of official Seed Analyst of North America Newsletter*, 26, 17.
- Werker, W.A. 1981. Seed dormancy as explained by the anatomy of embryo envelopes. *Israel Journal of Botany*. 29: 22-44.

Wood, C.B., Miles S., Rix C. Terry J. and M.I. Daws. The effect of seed oil content on viability assessment using tetrazolium: a case study using 171 species. *Plant Genetic Resources Newsletter*. 143: 17-23.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES GENERALES

PROPUESTA METODOLÓGICA

Recepción de la muestra

La muestra de *Cenchrus ciliaris* L. puede ingresar a laboratorio de dos maneras y éstas dependerán de la forma en que se comercialicen las semillas: cariósides o fascículos. En la República Argentina generalmente se comercializan fascículos. En el caso que la muestra ingresada al laboratorio sea de cariósides, la expresión de los resultados de los ensayos tanto de viabilidad por tetrazolio como de la prueba de germinación se harán directamente, o sea sin ajustar por el porcentaje de fascículos llenos (Figura 5.1).

Al realizar pureza física se discriminará como semilla pura a cada tipo de unidad de dispersión según la definición de semilla pura (PSD) establecida por las reglas ISTA. El homogeneizado de las muestras se hará acorde a las recomendaciones para semillas brozosas, utilizando el cuarteo u octaneo.

Calidad física

La determinación del porcentaje de fascículos llenos (% LI) se llevará a cabo cuando el material esté compuesto de fascículos. Para realizar el análisis se extraerán 4 repeticiones de 50 o 100 fascículos de la muestra remitida, tomados al azar. De cada fascículo se verificará la presencia de cariósides, aquellos fascículos que posean al menos una (1) cariósida serán registrados como llenos, y aquellos en los que no se encuentren cariósides serán vacíos. La expresión de fascículos llenos es una técnica que permite cuantificar el porcentaje de cariósides efectivamente formadas en unidades de dispersión de *Cenchrus ciliaris*. Se determinará utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ fascículos llenos: } \frac{N^{\circ} \text{ de fascículos con carióspside}}{N^{\circ} \text{ fascículos examinados}} \times 100$$

Debido a que cada fascículo puede contener generalmente de 1 a 5 carióspsides, se podrá calcular el número medio de carióspsides contenidos por fascículo. Esta valoración se puede realizar al mismo tiempo que se determina el porcentaje de fascículos llenos, registrando el número de carióspsides que posee cada fascículo. El número promedio de carióspsides formadas por fascículo es un claro indicativo de la prolificidad del material, el cual se traduce en las posibilidades de germinar que tiene cada unidad de dispersión. Podrá calcularse por la siguiente fórmula:

$$\text{Promedio de carióspsides por fascículo: } \frac{N^{\circ} \text{ carióspsides totales}}{N^{\circ} \text{ fascículos examinados}}$$

El cálculo del peso de 1000 fascículos junto a la determinación de fascículos llenos da la posibilidad de expresar el número de fascículos por unidad de peso y, además, conocer el número de fascículos llenos que el lote de semillas posee.

$$N^{\circ} \text{ fascículos por Kg} = \frac{1000 \text{ fascículos} * 1000 \text{ gr}}{\text{Peso } 1000 \text{ fascículos (gr)}}$$

La utilización o no de las carióspsides extraídas en los ensayos de calidad física dependerá de si es necesario realizar ensayos de viabilidad y/o de germinación. En dichos casos, se podrá expresar la viabilidad o la germinación como número de fascículos viables por Kg y/o fascículos germinables por Kg respectivamente.

Viabilidad por tetrazolio

La aplicación del protocolo de viabilidad de *Panicum* (ISTA, 2012) para *Cenchrus ciliaris* no es adecuado por dos motivos: los tiempos requeridos de tinción

para *Cenchrus ciliaris* fueron menores y el método de corte apropiado fue el longitudinal incompleto.

Por lo tanto, se sugiere:

Material: se podrá utilizar 4 repeticiones de 50 o 100 cariósides. Se recomienda por el reducido tamaño de las semillas la utilización de lupa binocular o diafanoscopio para la realización de cortes y la evaluación.

Acondicionamiento: Cada repetición se humedecerá entre papel de germinación durante 18 horas y a una temperatura de 20 °C.

Preparación antes del teñido/cortes: Realizar cortes longitudinales incompletos a través del embrión y 3/4 del endospermo. Este tipo de corte favorece la tinción y la visualización posterior de las estructuras esenciales de las semillas. La utilización de elementos de corte con adecuado filo es indispensable para evitar el desgarro de los tejidos seminales.

Tinción: Se podrán utilizar concentraciones de tetrazolio al 0,5 % o al 1 %. La opción de la utilización de una u otra concentración será principalmente económica.

Tiempo y temperatura: Las cariósides pasarán 10 horas de incubación a 30 °C, en completa oscuridad.

Evaluación: La evaluación se hará utilizando como guía los mapas topográficos desarrollados (Capítulo III). Los patrones de tinción permiten diferenciar de forma exacta la viabilidad de cariósides de *Cenchrus ciliaris*. Los resultados se expresarán en porcentaje de cariósides viables.

En aquellos casos que la muestra inicial sea de fascículos se ajustará el valor de cariósides viables con el porcentaje de fascículos llenos, según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ viabilidad ajustada: } \frac{\% \text{ cariósides viables} * \% \text{ fascículos llenos}}{100}$$

Germinación

Las condiciones generales del ensayo de germinación, como son la duración del análisis, la temperatura de germinación y el medio de crecimiento, serán de acuerdo a lo establecido por las reglas ISTA para *Cenchrus ciliaris*. La evaluación de la germinación se realizará según Manual de Evaluación de Plántulas de ISTA.

Los tratamientos recomendados por las reglas internacionales ISTA (2012) para romper dormición en *Cenchrus ciliaris* no son lo suficientemente efectivos ya que no favorecen la germinación de las semillas. Esto se debe a que existen impedimentos que dificultan la germinación, uno externo formado por involucreo, brácteas, glumas, lemma y páleas y otro interno, propio del pericarpio de las cariósides.

Por lo tanto, se sugiere:

Material: Utilizar 4 repeticiones de 50 o 100 cariósides escarificadas. La escarificación deberá realizarse con aguja en la región distal del fruto-semilla de manera de evitar daños en la región embrionaria

Medio de crecimiento: Sobre papel (TP: top paper). El medio de crecimiento arena (S: sand) sugerido también por ISTA, no resulta adecuado al utilizar cariósides por la dificultad en la evaluación debido al escaso tamaño de las semillas.

Temperatura de la cámara de germinación: 20<=>35; 20<=>30 °C; con régimen de temperatura y luz alternante: 8 h luz a 30 °C y 16 h oscuridad a 20 °C.

Duración del ensayo: Primer conteo 7 días, conteo final 28 días.

Para expresar los resultados de germinación en un lote de semillas compuesto por fascículos, se recomienda realizar el ensayo con cariósides, determinar el porcentaje de fascículos llenos y utilizarlo como factor de corrección.

$$\% \text{ germinación ajustada: } \frac{\% \text{ germinación cariósides} * \% \text{ fascículos llenos}}{100}$$

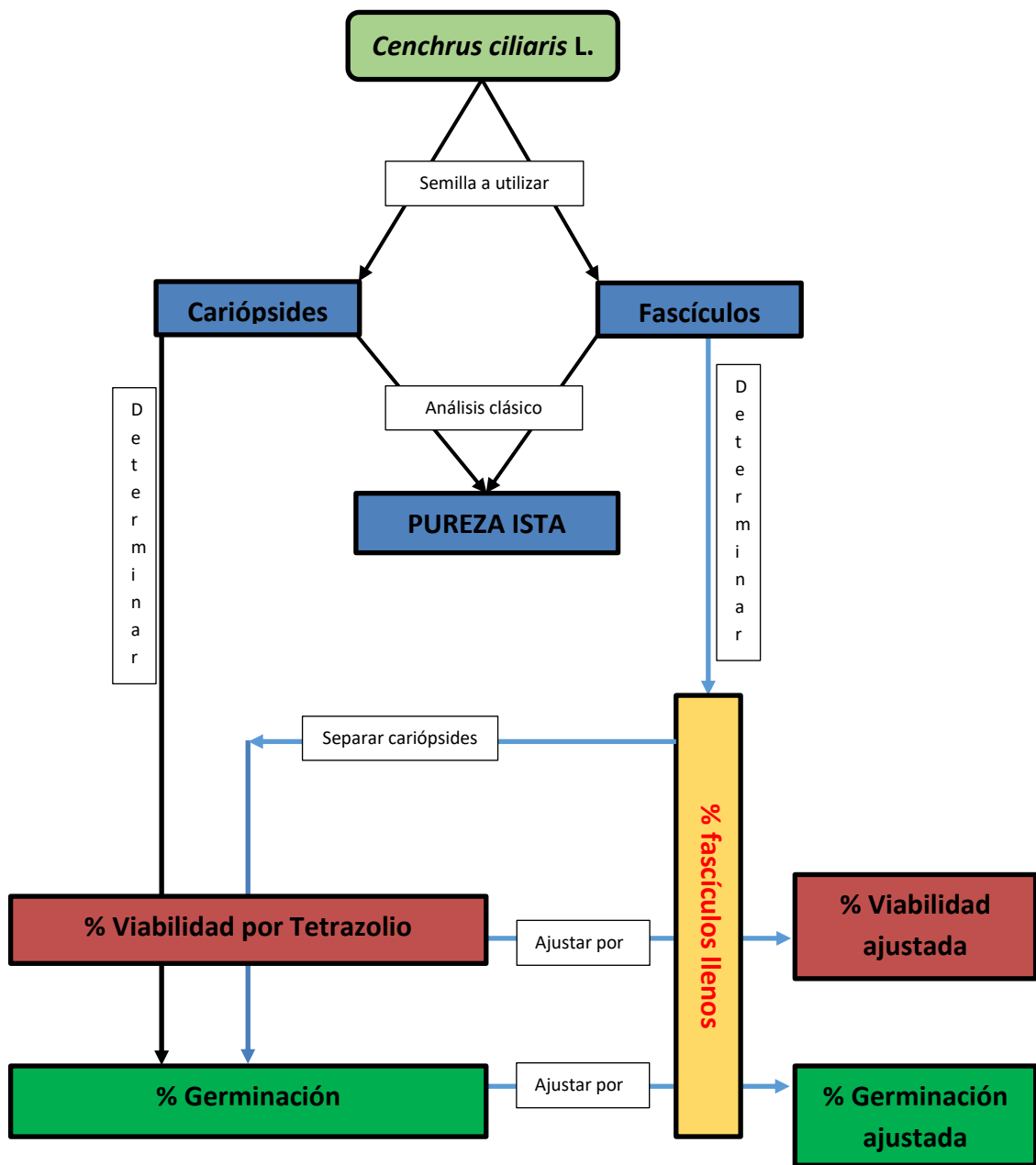


Fig. 5.1 Mapa conceptual que describe la metodología para la evaluación de la calidad física, viabilidad por tetrazolio y germinación en *Cenchrus ciliaris*.

FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Uno de los desafíos que se establece a futuro es validar el protocolo desarrollado de manera que pueda ser utilizado en los distintos cultivares de *Cenchrus ciliaris* que son comercializados y utilizados a nivel global. Para ello, una serie de preguntas deben ser resueltas de manera que el método de análisis propuesto sea repetible entre los distintos laboratorios.

- Realizar estudios anatómicos y fisiológicos, respecto a la participación del pericarpio en la dormición de las semillas y la influencia que tienen los distintos factores propios y del medio sobre esta condición.
- Profundizar estudios sobre el efecto de la aplicación de ácido giberélico en fascículos y en cariósides.
- Comparar distintos métodos de escarificación de las cariósides que permitan facilitar la tarea a los laboratoristas.
- Establecer en materiales de distintas procedencias la respuesta al escarificado sobre la viabilidad y la germinación.
- Estudiar la viabilidad en el tiempo de las cariósides extraídas de los fascículos y la posibilidad de almacenarlas para posteriores siembras.

**ANEXO I. ESTÁNDAR DE COMERCIALIZACIÓN DE
ESPECIES FORRAJERAS SUBTROPICALES (INASE).**

Especie	% SP	% SE	% PG	Plántulas germinadas/ kg	% Viabilidad (TZ)
Chloris gayana Kunth (Grama rhodes)	80	5	20	400.000	---
Cenchrus ciliaris L. (Fascicles) (Buffel grass)	80	5	20	---	35
Setaria sphacelata (Schumach.) Stapf & C. E. Hubb (=Setaria anceps) (Setaria)	70	5	40	---	50
Panicum maximum Jacq (Gatton panic)	90	5	15	---	25
Panicum coloratum L.(Panicum)	80	5	15	---	25
Digitaria eriantha Steud	80	5	15	---	25
Brachiaria brizantha (Hochst ex. A. Rich) Stapf	80	5	40	---	60
Brachiaria humidicola (Rendle) Schweick	80	5	25	---	50
Brachiaria decumbens Stapf	80	5	35	---	50
Dichantium aristatum (Poir.) C.E. Hubb.	40	5	30	---	---
Urochloa mosambicensis (Hack.) Dandy	40	5	15	---	---
Leucaena leucocephala (Lamb) de Witt (Leucaena)	60	5	20	---	---

Nota: La incorporación de las categorías "Plántulas germinadas por Kg" y "% Viabilidad (TZ)" no reemplaza al valor de poder germinativo, pero ofrecen valores de referencia a tener en cuenta para estimar la calidad de la semilla contenida en el envase cuando esta presente problemas de dormancia.

ANEXO II. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Texas + Biloela: sin almacenamiento

Modelos lineales generales y mixtos

Especificación del modelo en R

```
modelo.000_ajuste_REML<-
glm(ajuste~1+trat+material+genotipo+trat:material+trat:genotipo+material:genotipo+trat:mater
ial:genotipo
,method="REML"
,na.action=na.omit
,data=R.data00)
```

Resultados para el modelo: modelo.000_ajuste_REML

Variable dependiente: ajuste

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
160	1125,09	1239,37	-521,54	14,82	0,84	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3195,95	<0,0001
trat	4	4,39	0,0024
material	3	170,10	<0,0001
genotipo	1	27,26	<0,0001
trat:material	12	2,68	0,0031
trat:genotipo	4	5,46	0,0004
material:genotipo	3	6,61	0,0004
trat:material:genotipo	12	1,77	0,0609

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3195,95	<0,0001
trat	4	4,39	0,0024
material	3	170,10	<0,0001
genotipo	1	27,26	<0,0001
trat:material	12	2,68	0,0031
trat:genotipo	4	5,46	0,0004
material:genotipo	3	6,61	0,0004
trat:material:genotipo	12	1,77	0,0609

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para trat

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

trat	Medias	E.E.	
calor	72,04	2,62	A
testigo	69,16	2,62	A
nittrato	66,69	2,62	A
frio	65,95	2,62	A
giberelico	57,40	2,62	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para material

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

material	Medias	E.E.		
F	98,42	2,34	A	
C	77,17	2,34		B
FE	63,68	2,34		C

CE 25,72 2,34 D
 Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para genotipo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

genotipo	Medias	E.E.	
biloeala	72,37	1,66	A
texas	60,13	1,66	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para trat*material

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

trat	material	Medias	E.E.		
calor	F	100,00	5,24	A	
testigo	F	100,00	5,24	A	
nittrato	F	98,68	5,24	A	
giberelico	F	97,37	5,24	A	
frio	F	96,05	5,24	A	
calor	C	88,82	5,24	A	
testigo	C	88,82	5,24	A	
calor	FE	77,63	5,24		B
frio	C	76,64	5,24		B
nittrato	FE	73,68	5,24		B
giberelico	C	68,75	5,24		B
frio	FE	64,47	5,24		B
nittrato	C	62,83	5,24		B
testigo	FE	56,58	5,24		B
giberelico	FE	46,05	5,24		C
nittrato	CE	31,58	5,24		D
testigo	CE	31,25	5,24		D
frio	CE	26,64	5,24		D
calor	CE	21,71	5,24		D
giberelico	CE	17,43	5,24		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para trat*genotipo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

trat	genotipo	Medias	E.E.		
nittrato	biloeala	76,97	3,71	A	
calor	biloeala	72,04	3,71	A	
calor	texas	72,04	3,71	A	
giberelico	biloeala	71,71	3,71	A	
frio	biloeala	71,05	3,71	A	
testigo	biloeala	70,07	3,71	A	
testigo	texas	68,26	3,71	A	
frio	texas	60,86	3,71		B
nittrato	texas	56,41	3,71		B
giberelico	texas	43,09	3,71		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para material*genotipo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

material	genotipo	Medias	E.E.		
F	biloeala	98,95	3,31	A	
F	texas	97,89	3,31	A	
C	biloeala	91,32	3,31	A	
FE	biloeala	66,32	3,31		B
C	texas	63,03	3,31		B
FE	texas	61,05	3,31		B
CE	biloeala	32,89	3,31		C
CE	texas	18,55	3,31		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para trat*material*genotipo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

trat	material	genotipo	Medias	E.E.		
nittrato	F	biloeela	100,00	7,41	A	
calor	F	biloeela	100,00	7,41	A	
giberelico	F	biloeela	100,00	7,41	A	
testigo	F	biloeela	100,00	7,41	A	
calor	F	texas	100,00	7,41	A	
testigo	F	texas	100,00	7,41	A	
nittrato	F	texas	97,37	7,41	A	
frio	F	texas	97,37	7,41	A	
giberelico	F	texas	94,74	7,41	A	
frio	F	biloeela	94,74	7,41	A	
giberelico	C	biloeela	93,42	7,41	A	
testigo	C	biloeela	93,42	7,41	A	
nittrato	C	biloeela	92,11	7,41	A	
calor	C	biloeela	90,79	7,41	A	
calor	C	texas	86,84	7,41	A	
frio	C	biloeela	86,84	7,41	A	
testigo	C	texas	84,21	7,41	A	
calor	FE	biloeela	78,95	7,41	A	
nittrato	FE	texas	78,95	7,41	A	
calor	FE	texas	76,32	7,41	A	
frio	FE	biloeela	73,68	7,41	A	
nittrato	FE	biloeela	68,42	7,41	A	
frio	C	texas	66,45	7,41	A	
testigo	FE	texas	60,53	7,41		B
giberelico	FE	biloeela	57,89	7,41		B
frio	FE	texas	55,26	7,41		B
testigo	FE	biloeela	52,63	7,41		B
nittrato	CE	biloeela	47,37	7,41		B
giberelico	C	texas	44,08	7,41		B
giberelico	CE	biloeela	35,53	7,41		C
giberelico	FE	texas	34,21	7,41		C
testigo	CE	biloeela	34,21	7,41		C
nittrato	C	texas	33,55	7,41		C
frio	CE	biloeela	28,95	7,41		C
testigo	CE	texas	28,29	7,41		C
calor	CE	texas	25,00	7,41		C
frio	CE	texas	24,34	7,41		C
calor	CE	biloeela	18,42	7,41		C
nittrato	CE	texas	15,79	7,41		C
giberelico	CE	texas	-0,66	7,41		D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Texas + Biloela: 3 meses de almacenamiento

Modelos lineales generales y mixtos

Especificación del modelo en R

```
modelo.000_ajuste_REML<-
glm(ajuste~1+trat+material+genotipo+trat:material+trat:genotipo+material:genotipo+trat:mater
rial:genotipo
,method="REML"
,na.action=na.omit
,data=R.data00)
```

Resultados para el modelo: modelo.000_ajuste_REML

Variable dependiente: ajuste

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
160	1170,92	1285,21	-544,46	17,94	0,79	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	389,46	<0,0001
trat	4	3,10	0,0180
material	3	121,81	<0,0001
genotipo	1	12,59	0,0006
trat:material	12	1,85	0,0478
trat:genotipo	4	2,84	0,0273
material:genotipo	3	3,23	0,0249
trat:material:genotipo	12	2,34	0,0098

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	389,46	<0,0001
trat	4	3,10	0,0180
material	3	121,81	<0,0001
genotipo	1	12,59	0,0006
trat:material	12	1,85	0,0478
trat:genotipo	4	2,84	0,0273
material:genotipo	3	3,23	0,0249
trat:material:genotipo	12	2,34	0,0098

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para trat

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

trat	Medias	E.E.	
frio	33,72	3,17	A
nittrato	29,85	3,17	A
calor	29,19	3,17	A
testigo	28,54	3,17	A
giberelico	18,67	3,17	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para material

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

material	Medias	E.E.	
F	71,05	2,84	A
FE	31,32	2,84	B
C	5,26	2,84	C
CE	4,34	2,84	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para genotipo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

genotipo	Medias	E.E.	
texas	33,03	2,01	A
biloela	22,96	2,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para trat*material

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

trat	material	Medias	E.E.	
frio	F	77,63	6,34	A
calor	F	76,32	6,34	A
nittrato	F	72,37	6,34	A
giberelico	F	67,11	6,34	A
testigo	F	61,84	6,34	A
nittrato	FE	48,68	6,34	B
frio	FE	38,16	6,34	B
testigo	FE	36,84	6,34	B
calor	FE	25,00	6,34	B
frio	C	12,17	6,34	C

testigo	C	11,18	6,34	C
calor	CE	11,18	6,34	C
giberelico	FE	7,89	6,34	C
frio	CE	6,91	6,34	C
calor	C	4,28	6,34	C
testigo	CE	4,28	6,34	C
giberelico	CE	0,33	6,34	C
nitrato	C	-0,66	6,34	C
giberelico	C	-0,66	6,34	C
nitrato	CE	-0,99	6,34	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para trat*genotipo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

trat	genotipo	Medias	E.E.	
frio	texas	47,70	4,49	A
calor	texas	34,38	4,49	B
nittrato	texas	33,72	4,49	B
testigo	texas	30,43	4,49	B
testigo	biloea	26,64	4,49	B
nittrato	biloea	25,99	4,49	B
calor	biloea	24,01	4,49	B
frio	biloea	19,74	4,49	B
giberelico	texas	18,91	4,49	B
giberelico	biloea	18,42	4,49	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para material*genotipo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

material	genotipo	Medias	E.E.				
F	texas	77,89	4,01	A			
F	biloea	64,21	4,01		B		
FE	texas	42,63	4,01			C	
FE	biloea	20,00	4,01				D
C	texas	7,37	4,01				E
CE	biloea	4,47	4,01				E
CE	texas	4,21	4,01				E
C	biloea	3,16	4,01				E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para trat*material*genotipo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

trat	material	genotipo	Medias	E.E.				
nittrato	F	texas	92,11	8,97	A			
calor	F	texas	84,21	8,97	A			
frio	F	texas	81,58	8,97	A			
frio	FE	texas	76,32	8,97	A			
giberelico	F	biloea	73,68	8,97	A			
frio	F	biloea	73,68	8,97	A			
testigo	F	texas	71,05	8,97	A			
calor	F	biloea	68,42	8,97	A			
giberelico	F	texas	60,53	8,97		B		
nittrato	F	biloea	52,63	8,97		B		
nittrato	FE	biloea	52,63	8,97		B		
testigo	F	biloea	52,63	8,97		B		
nittrato	FE	texas	44,74	8,97		B		
calor	FE	texas	39,47	8,97		B		
testigo	FE	texas	36,84	8,97		B		
testigo	FE	biloea	36,84	8,97		B		
frio	C	texas	19,08	8,97			C	
giberelico	FE	texas	15,79	8,97			C	
calor	CE	biloea	14,47	8,97			C	
testigo	C	texas	14,47	8,97			C	
frio	CE	texas	13,82	8,97			C	
calor	FE	biloea	10,53	8,97			C	
testigo	CE	biloea	9,21	8,97			C	
testigo	C	biloea	7,89	8,97			C	

calor	CE	texas	7,89	8,97	C
calor	C	texas	5,92	8,97	C
frio	C	biloeala	5,26	8,97	C
calor	C	biloeala	2,63	8,97	C
giberelico	CE	texas	0,66	8,97	C
frio	FE	biloeala	0,00	8,97	C
giberelico	C	biloeala	0,00	8,97	C
nittrato	C	biloeala	0,00	8,97	C
frio	CE	biloeala	0,00	8,97	C
giberelico	CE	biloeala	0,00	8,97	C
giberelico	FE	biloeala	0,00	8,97	C
testigo	CE	texas	-0,66	8,97	C
nittrato	CE	texas	-0,66	8,97	C
nittrato	C	texas	-1,32	8,97	C
giberelico	C	texas	-1,32	8,97	C
nittrato	CE	biloeala	-1,32	8,97	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Texas + Biloela: 6 meses almacenamiento

Modelos lineales generales y mixtos

Especificación del modelo en R

```
modelo.000_ajuste_REML<-
glm(ajuste~1+trat+material+genotipo+trat:material+trat:genotipo+material:genotipo+trat:mater
rial:genotipo
,method="REML"
,na.action=na.omit
,data=R.data00)
```

Resultados para el modelo: modelo.000_ajuste_REML

Variable dependiente: ajuste

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
160	1169,38	1283,66	-543,69	17,83	0,72	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	193,17	<0,0001
trat	4	0,22	0,9289
material	3	80,79	<0,0001
genotipo	1	3,44	0,0660
trat:material	12	0,87	0,5827
trat:genotipo	4	3,98	0,0045
material:genotipo	3	2,28	0,0829
trat:material:genotipo	12	2,32	0,0105

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	193,17	<0,0001
trat	4	0,22	0,9289
material	3	80,79	<0,0001
genotipo	1	3,44	0,0660
trat:material	12	0,87	0,5827
trat:genotipo	4	3,98	0,0045
material:genotipo	3	2,28	0,0829
trat:material:genotipo	12	2,32	0,0105

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para trat

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

trat	Medias	E.E.	
frio	21,22	3,15	A
testigo	20,72	3,15	A
calor	19,82	3,15	A
giberelico	18,34	3,15	B
nittrato	17,85	3,15	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para material

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

material	Medias	E.E.	
F	53,95	2,82	A
FE	23,42	2,82	B
CE	1,32	2,82	C
C	-0,33	2,82	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para genotipo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

genotipo	Medias	E.E.	
texas	22,20	1,99	A
biloela	16,97	1,99	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para trat*material

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

trat	material	Medias	E.E.	
testigo	F	65,79	6,30	A
calor	F	56,58	6,30	A
giberelico	F	51,32	6,30	A
nittrato	F	48,68	6,30	A
frio	F	47,37	6,30	A
frio	FE	31,58	6,30	B
calor	FE	25,00	6,30	B
giberelico	FE	25,00	6,30	B
nittrato	FE	18,42	6,30	B
testigo	FE	17,11	6,30	B
nittrato	CE	5,92	6,30	C
frio	CE	5,59	6,30	C
testigo	C	2,96	6,30	C
frio	C	0,33	6,30	C
giberelico	CE	-0,66	6,30	C
calor	C	-0,99	6,30	C
calor	CE	-1,32	6,30	C
nittrato	C	-1,64	6,30	C
giberelico	C	-2,30	6,30	C
testigo	CE	-2,96	6,30	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para trat*genotipo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

trat	genotipo	Medias	E.E.	
frio	texas	31,25	4,46	A
calor	texas	27,80	4,46	A
testigo	texas	22,70	4,46	B
nittrato	biloela	21,71	4,46	B
giberelico	biloela	21,38	4,46	B
testigo	biloela	18,75	4,46	B
giberelico	texas	15,30	4,46	B
nittrato	texas	13,98	4,46	B
calor	biloela	11,84	4,46	B
frio	biloela	11,18	4,46	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para material*genotipo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

material	genotipo	Medias	E.E.			
F	texas	62,63	3,99	A		
F	biloeila	45,26	3,99		B	
FE	texas	25,79	3,99			C
FE	biloeila	21,05	3,99			C
CE	biloeila	2,11	3,99			D
CE	texas	0,53	3,99			D
C	texas	-0,13	3,99			D
C	biloeila	-0,53	3,99			D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para trat*material*genotipo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

trat	material	genotipo	Medias	E.E.		
calor	F	texas	71,05	8,91	A	
testigo	F	texas	68,42	8,91	A	
giberelico	F	texas	65,79	8,91	A	
testigo	F	biloeila	63,16	8,91	A	
frio	F	texas	63,16	8,91	A	
nittrato	F	biloeila	52,63	8,91	A	
frio	FE	texas	52,63	8,91	A	
giberelico	FE	biloeila	47,37	8,91	A	
nittrato	F	texas	44,74	8,91	A	
calor	FE	texas	44,74	8,91	A	
calor	F	biloeila	42,11	8,91	A	
giberelico	F	biloeila	36,84	8,91	A	
frio	F	biloeila	31,58	8,91	A	
nittrato	FE	biloeila	26,32	8,91	A	
testigo	FE	texas	18,42	8,91		B
testigo	FE	biloeila	15,79	8,91		B
frio	FE	biloeila	10,53	8,91		B
nittrato	FE	texas	10,53	8,91		B
testigo	C	texas	8,55	8,91		B
nittrato	CE	biloeila	7,89	8,91		B
frio	CE	texas	7,24	8,91		B
calor	FE	biloeila	5,26	8,91		B
frio	CE	biloeila	3,95	8,91		B
nittrato	CE	texas	3,95	8,91		B
giberelico	FE	texas	2,63	8,91		B
frio	C	texas	1,97	8,91		B
calor	C	biloeila	1,32	8,91		B
giberelico	CE	biloeila	1,32	8,91		B
nittrato	C	biloeila	0,00	8,91		B
giberelico	C	biloeila	0,00	8,91		B
calor	CE	texas	-1,32	8,91		B
testigo	CE	biloeila	-1,32	8,91		B
frio	C	biloeila	-1,32	8,91		B
calor	CE	biloeila	-1,32	8,91		B
giberelico	CE	texas	-2,63	8,91		B
testigo	C	biloeila	-2,63	8,91		B
nittrato	C	texas	-3,29	8,91		B
calor	C	texas	-3,29	8,91		B
testigo	CE	texas	-4,61	8,91		B
giberelico	C	texas	-4,61	8,91		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Texas + Biloela: 9 meses de almacenamiento

Modelos lineales generales y mixtos

Especificación del modelo en R

```

modelo.000_ajuste_REML<-
gls(ajuste~1+trat+material+genotipo+trat:material+trat:genotipo+material:genotipo+trat:mater
rial:genotipo
,method="REML"
,na.action=na.omit
,data=R.data00)

```

Resultados para el modelo: modelo.000_ajuste_REML

Variable dependiente: ajuste

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
160	1227,02	1341,31	-572,51	22,67	0,59	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis marginales (SC tipo III)

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	116,89	<0,0001
trat	4	0,66	0,6230
material	3	42,67	<0,0001
genotipo	1	0,88	0,3511
trat:material	12	0,69	0,7568
trat:genotipo	4	0,18	0,9503
material:genotipo	3	9,65	<0,0001
trat:material:genotipo	12	0,41	0,9582

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	116,89	<0,0001
trat	4	0,66	0,6230
material	3	42,67	<0,0001
genotipo	1	0,88	0,3511
trat:material	12	0,69	0,7568
trat:genotipo	4	0,18	0,9503
material:genotipo	3	9,65	<0,0001
trat:material:genotipo	12	0,41	0,9582

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para trat

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

trat	Medias	E.E.	
testigo	24,10	4,01	A
calor	19,82	4,01	B
frio	19,08	4,01	B
nitrato	18,91	4,01	B
giberelico	14,97	4,01	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para material

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

material	Medias	E.E.	
FE	41,05	3,58	A
F	38,16	3,58	A
CE	0,39	3,58	B
C	-2,11	3,58	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para genotipo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

genotipo	Medias	E.E.	
texas	21,05	2,53	A
biloela	17,70	2,53	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para trat*material

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

trat	material	Medias	E.E.	
testigo	F	47,37	8,01	A
calor	F	47,37	8,01	A

frio	FE	46,05	8,01	A	
calor	FE	43,42	8,01	A	
nittrato	F	42,11	8,01	A	
nittrato	FE	40,79	8,01	A	
giberelico	FE	38,16	8,01	A	
testigo	FE	36,84	8,01	A	
frio	F	28,95	8,01	A	
giberelico	F	25,00	8,01	A	
testigo	C	6,91	8,01		B
testigo	CE	5,26	8,01		B
frio	CE	2,63	8,01		B
nittrato	CE	0,99	8,01		B
frio	C	-1,32	8,01		B
giberelico	C	-1,64	8,01		B
giberelico	CE	-1,64	8,01		B
calor	CE	-5,26	8,01		B
calor	C	-6,25	8,01		B
nittrato	C	-8,22	8,01		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para trat*genotipo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

trat	genotipo	Medias	E.E.		
testigo	texas	27,47	5,67	A	
frio	texas	22,37	5,67		B
testigo	biloeala	20,72	5,67		B
calor	biloeala	20,39	5,67		B
nittrato	texas	19,74	5,67		B
calor	texas	19,24	5,67		B
nittrato	biloeala	18,09	5,67		B
giberelico	texas	16,45	5,67		B
frio	biloeala	15,79	5,67		B
giberelico	biloeala	13,49	5,67		B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para material*genotipo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

material	genotipo	Medias	E.E.		
F	texas	55,26	5,07	A	
FE	biloeala	50,53	5,07	A	
FE	texas	31,58	5,07		B
F	biloeala	21,05	5,07		B
CE	biloeala	1,32	5,07		C
CE	texas	-0,53	5,07		C
C	texas	-2,11	5,07		C
C	biloeala	-2,11	5,07		C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

ajuste - Medias ajustadas y errores estándares para trat*material*genotipo

DGC (Alfa=0.05)

Procedimiento de corrección de p-valores: No

trat	material	genotipo	Medias	E.E.	
testigo	F	texas	68,42	11,33	A
calor	F	texas	63,16	11,33	A
frio	FE	biloeala	57,89	11,33	A
frio	F	texas	52,63	11,33	A
giberelico	FE	biloeala	52,63	11,33	A
calor	FE	biloeala	52,63	11,33	A
testigo	FE	biloeala	47,37	11,33	A
nittrato	F	texas	47,37	11,33	A
giberelico	F	texas	44,74	11,33	A
nittrato	FE	biloeala	42,11	11,33	A
nittrato	FE	texas	39,47	11,33	A
nittrato	F	biloeala	36,84	11,33	A
frio	FE	texas	34,21	11,33	A
calor	FE	texas	34,21	11,33	A
calor	F	biloeala	31,58	11,33	A
testigo	F	biloeala	26,32	11,33	A
testigo	FE	texas	26,32	11,33	A
giberelico	FE	texas	23,68	11,33	A

testigo	CE	texas	7,89	11,33	B
testigo	C	texas	7,24	11,33	B
testigo	C	biloela	6,58	11,33	B
frio	F	biloela	5,26	11,33	B
giberelico	F	biloela	5,26	11,33	B
frio	CE	biloela	3,95	11,33	B
testigo	CE	biloela	2,63	11,33	B
frio	CE	texas	1,32	11,33	B
nitrato	CE	biloela	1,32	11,33	B
frio	C	texas	1,32	11,33	B
nitrato	CE	texas	0,66	11,33	B
calor	CE	biloela	0,00	11,33	B
giberelico	C	texas	-0,66	11,33	B
giberelico	CE	biloela	-1,32	11,33	B
giberelico	CE	texas	-1,97	11,33	B
giberelico	C	biloela	-2,63	11,33	B
calor	C	biloela	-2,63	11,33	B
frio	C	biloela	-3,95	11,33	B
nitrato	C	biloela	-7,89	11,33	B
nitrato	C	texas	-8,55	11,33	B
calor	C	texas	-9,87	11,33	B
calor	CE	texas	-10,53	11,33	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)